

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

PCT

国 3



特許協力条約に基

WO 9603503A1

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/81, 1/19, C12P 21/02, C07K 14/47, 14/81, C12N 9/99		A (43) 国際公開日 1996年2月8 (02.96)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01449 (22) 国際出願日 1995年7月21日(21.07.95) (30) 優先権データ 特願平6/169221 1994年7月21日(21.07.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ミドリ十字 (THE GREEN CROSS CORPORATION)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区今橋一丁目3番3号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 井手野祥次(IDENO, Shoji)[JP/JP] 後藤 節(GOTO, Takashi)[JP/JP] 堀井 肇(HORII, Hajime)[JP/JP] 〒573 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社 ミドリ十字 中央研究所内 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 補正書	
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING URINARY TRYPSIN INHIBITOR AND DOMAINS THEREOF, NOVEL POLYPEPTIDE RELATED TO THE BOTH, AND PROCESS FOR PRODUCING THE POLYPEPTIDE (54) 発明の名称 尿性トリプシンインヒビターおよびそのドメインの製造方法、並びにそれらに関連する新規ポリペプチドお よびその製造方法 (57) Abstract A process for producing a urinary human trypsin inhibitor (UTI) and domains thereof by using a yeast of the genus <i>Pichia</i> as the host cell; an expression system related thereto; a novel polypeptide at least having the amino acid sequence represented by formula (I) in the specification; a DNA coding for the same; an expression vector containing the DNA; a transformant containing the vector; and a process for producing the polypeptide. The above UTI, expression system of each domain thereof, and process for producing the UTI and domains thereof enable UTI and domains thereof to be mass-produced readily and efficiently. The use of the expression system facilitates the preparation of variants or derivatives of UTI and so forth and contributes to the development of novel medicines such as a protease inhibitor. The invention also provides a novel useful polypeptide which is more excellent in elastase inhibitory activity than natural UTI and can be mass-produced.			

(57) 要約

ピキア属酵母を宿主細胞とすることを特徴とする遺伝子工学的手法による尿性ヒトリブシンインヒビター (UTI) 並びにその各ドメインの製造法、及びこれに関連する発現系。明細書中式 I で示されるアミノ酸配列を少なくとも有する新規ポリペプチド、それをコードする DNA、該 DNA を含有する発現ベクター、該ベクターを含有する形質転換体及び当該ポリペプチドの製造方法。

本発明のピキア属酵母からなる UTI、その各ドメインの発現系およびそれらの製造法は、UTI 及びその各ドメインの簡便且つ効率的な量産を可能とする。また当該系により、UTI 等の変異体または誘導体の作成を容易にし、有用なプロテアーゼ阻害剤の開発等新たな医薬品の開発に寄与しう。また天然型 UTI よりエラスターゼ阻害活性が優れ、好ましくはさらに大量製造可能な有用な新規ポリペプチド、およびその製造法を提供する。

情報としての用途のみ

PCT に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に PCT 加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴ	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー		スラヴィア共和国	TD	チャード
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	米国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム

## 明細書

尿性トリプシンインヒビターおよびそのドメインの製造方法、並びにそれらに関連する新規ポリペプチドおよびその製造方法

## 〔技術分野〕

本発明は、尿性トリプシンインヒビター（以下、単にUTIという）およびそのKunitz型ドメインをピキア属酵母を宿主細胞として遺伝子工学的手法により製造する方法に関する。さらに、本発明はプロテアーゼ阻害活性に優れる新規ポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするDNA、当該DNAを有するベクター、当該ベクターで形質転換された形質転換体および当該形質転換体を培養することを特徴とする当該新規ポリペプチドの製造方法に関する。

## 〔背景技術〕

急性肺炎に代表される炎症では、炎症局所組織の破壊や併発する細菌感染によってインターロイキン-6、インターロイキン-8、腫瘍壊死因子（TNF）等の各種サイトカインが誘導され、その結果として組織、臓器での好中球の遊走・活性化が起こる。このような病態は播種性血管内凝固症候群（DIC）や多臓器不全（Multiple Organ Failure：MOF）を惹起し、重篤な症状を引き起こす。

局所での炎症の発生からMOFやDIC等の全身病態への移行で特徴的な点は（1）局所から全身への病態の進行が、短時間に急激に進行する事、（2）最終的には、活性化された好中球の放出するエラスターゼ（HNE）や脾臓細胞の放出するエラスターゼ（HPE）等のプロテアーゼが関与する事の二点にある。従って、肺炎等の治療では炎症初期にその進行を抑制する事と、プロテアーゼの阻害の二つのアプローチが考えられている。しかし前者のアプローチでは複数の因子が関与している事や、進行が急激である事などから有効な薬剤の開発が困難であり、現状では新規開発も含めて後者のアプローチが有効と考えられている。

かかる観点のもと、現在、肺炎に代表される炎症の治療では、低分子の合成プロテアーゼインヒビターや、生体成分である蛋白性プロテアーゼインヒビターが使用されている。しかし、現行製剤中にはエラスターゼ阻害活性を示す製剤が殆

ど認められず、エラスターゼ阻害活性を有するプロテアーゼインヒビターの開発が望まれている。

主な蛋白性プロテアーゼインヒビターのうちエラスターゼ阻害活性を有するものとして、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン ( $\alpha 1$ -AT) と UTI が挙げられるが、いずれも主として好中球エラスターゼを阻害する。

$\alpha 1$ -AT は血液中に大量に存在するセリンプロテアーゼインヒビターであり、好中球エラスターゼに対し強力な阻害活性を示すが、活性酸素によって容易に失活することが知られている。

一方、UTI のエラスターゼ阻害活性は  $\alpha 1$ -AT に比べて弱いことが知られている。また、UTI はヒト尿中より精製される蛋白質なので、大量に生産する場合には原材料の確保が困難であり、また原材料が不均一であるため成分の一定な製剤を製造することも難しい。更には未知成分やヒト感染性ウイルスの混入といった生体成分由来の製剤一般に共通する問題も考慮しなくてはならない。さらに UTI およびそのドメイン並びにそれらに関連する新規ポリペプチドを遺伝子工学的手法により大量に製造する報告はなく、すなわち遺伝子工学的手法により大量に製造し得る該ポリペプチド分子は知られていない。

このように現在医薬品として使用されている蛋白性プロテアーゼインヒビターには、解決すべき問題点が多数残されている。従って、生体内のプロテアーゼが関与する疾患の治療を可能にするためには、当該プロテアーゼを阻害する有用な蛋白性プロテアーゼインヒビターの大量製造法の確立、また更にプロテアーゼ阻害活性に優れた新規物質の開発が必要である。

#### 〔発明の開示〕

本発明の目的は、UTI およびその各ドメインを遺伝子工学的手法により、なにかんづくピキア属酵母を宿主細胞として製造する新たな方法を提供することである。また、強い好中球エラスターゼ阻害活性を有し、好ましくは更に遺伝子工学的手法により大量に製造し得る有用な新規ポリペプチド、並びにその遺伝子工学的手法による製造方法を提供することである。

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、UTIのcDNAをクローニングし、UTIおよび各ドメインをピキア属酵母を宿主細胞として発現、產生することに成功し、それらの蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法を確立した。さらに天然型UTIの短所である好中球エラスターゼ阻害活性の弱さを改善し、より強い好中球エラスターゼ阻害活性を有し、好ましくは更にトリプシン阻害活性をも有する新規ポリペプチドを作り出す目的で様々な検討を行った結果、UTIの一部のアミノ酸を置換してなるアミノ酸置換型UTIおよび活性ドメインのみをもつ短縮型UTIに上記の有用な性質を見出し、さらに当該蛋白質を遺伝子工学的に大量に製造することに成功して本発明を完成した。

即ち、本発明の概要は、以下の通りである。

(1) UTIのKunitz型ドメイン1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有するピキア属酵母用発現ベクター、UTIのKunitz型ドメイン2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有するピキア属酵母用発現ベクター、UTIのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有するピキア属酵母用発現ベクター。

(2) (1)に記載のいずれかのピキア属酵母用発現ベクターで形質転換されたピキア属酵母。

(3) (2)に記載のピキア属酵母を培養し、UTIの、少なくとも1種のKunitz型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質を産生させ、得られる培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、UTIの少なくとも1種のKunitz型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質の製造方法。

(4) 少なくとも式Iで示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-  
Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-  
Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-  
Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn- (式 I)  
Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-  
Cys

当該新規ポリペプチドは、式III で示されるアミノ酸配列を有していてもよい

。

Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val  
Arg-Gly-Pro-Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-  
Trp-Ala-Phe-Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-  
Val-Leu-Phe-Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-  
Asn-Gly-Asn-Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu- (式 III)  
Cys-Arg-Glu-Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-  
Gly-Asp-Glu-Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

当該新規ポリペプチドとしては、下記式IXのアミノ酸配列を有するポリペプチドが好適に用いられる。

Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-  
Ala-Gly-Pro-Cys-Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-Arg-  
Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-  
Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-  
Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu-  
Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-  
Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-Cys-  
Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-Asp-  
Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-Pro-  
Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-Lys-  
Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu-Tyr- (式IX)  
Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-Glu-  
Leu-Leu-Arg-Phe

また、これらポリペプチドは、N末端側に式IIで示されるアミノ酸配列を有していてもよい。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr- (式II)  
Lys

好ましくは、式IVで示されるアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドである。



Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-  
Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-  
Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-  
Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-  
Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-  
Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-  
Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-  
Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-  
Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-  
Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-  
Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-  
Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu- (式IV)  
Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-  
Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

(5) 好中球エラスターゼに対する阻害活性を有する(4)記載の新規ポリペプチド。

(6) トリプシンに対する阻害活性を有し、かつ天然型UTIに比して好中球エラスターゼに対する阻害活性が増強された(4)記載の新規ポリペプチド。

(7) (4)～(6)のいずれかに記載の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とするDNA。

(8) (7)記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。

(9) (8)のベクターで形質転換された形質転換体。

(10) (9)記載の形質転換体を培養して、(4)～(6)記載の新規ポリペプチドを産生させ、得られる培養物から当該新規ポリペプチドを採取することを特徴とする(4)～(6)記載の新規ポリペプチドの製造方法。

(11) プロテアーゼインヒビターの活性部位を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'末端側に、下記式(II)のアミノ酸配列をコードする塩基配列が結合されたベクターにて形質転換された形質転換体を培養することを特徴とするプロテアーゼインヒビターの発現増強方法。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-      (式II)  
Lys

〔図面の簡単な説明〕

図1は、尿中より単離されたUTIの一次構造を示す図である (Watcher, E and Hochstrasser, K., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1351, 1981)。

図2は、UTIのKunitz型ドメイン1およびKunitz型ドメイン2の一次構造を示す図である。

図3は、クローニングしたUTICDNAの塩基配列(-20~240)を示す図である。塩基番号は、J.F.Kaumeyer等, Nucl. Acids Res. 14(20), 7839-7850 (1986) の報告に従った。

図4は、クローニングしたUTICDNAの塩基配列(241~540)を示す図である。塩基番号は、J.F.Kaumeyer等, Nucl. Acids Res. 14(20), 7839-7850 (1986) の報告に従った。なお、図中の制限酵素サイトは、各実施例で使用したものを示した。

図5は、クローニングしたUTICDNAの塩基配列(541~780)を示す図である。塩基番号は、J.F.Kaumeyer等, Nucl. Acids Res. 14(20), 7839-7850 (1986) の報告に従った。UTIのcDNAから求めたアミノ酸配列を下段に示す。なお、図中の制限酵素サイトは、各実施例で使用したものを示した。

図6は、クローニングしたUTICDNAの塩基配列(781~1020)を

示す図である。塩基番号は、J.F.Kaumeyer等, Nucl. Acads Res. 14(20), 7839-7850 (1986) の報告に従った。UT I の cDNA から求めたアミノ酸配列を下段に示す。なお、図中の制限酵素サイトは、各実施例で使用したものを示した。

図7は、クローニングしたUT I cDNA の塩基配列 (1021~1235) を示す図である。塩基番号は、J.F.Kaumeyer等, Nucl. Acads Res. 14(20), 7839-7850 (1986) の報告に従った。UT I の cDNA から求めたアミノ酸配列を下段に示す。なお、図中の制限酵素サイトは、各実施例で使用したものを示した。

図8は、UT I のN末端をコードする領域、C末端をコードする領域の改変塩基配列を示す図である。

図9は、#7/B b e I - E R I の構築工程を示す図である。

図10は、#7/B b e I - E R I から pUT I - N の構築工程を示す図である。

図11は、#7/B b e I - E R I から pUT I - C の構築工程を示す図である。

図12は、pUT I N - C の構築工程を示す図である。

図13は、pUT I N - C / E R I を構築する工程を示す図である。

図14は、pUT I N - C / E R I および pA O 8 0 7 N の制限酵素地図、および pHH 3 1 0 の構築工程を示す図である。

図15は、SUC 2 シグナルの塩基配列を示す図である。

図16は、UT I の K u n i t z 型ドメイン1のC末端をコードする領域を補う合成DNAの塩基配列を示す図である。

図17は、UT I の K u n i t z 型ドメイン2のN末端をコードする領域を補う合成DNAの塩基配列を示す図である。

図18は、UT I のN末ペプチド付加 K u n i t z 型ドメイン1および K u n i t z 型ドメイン2の遺伝子ユニットを示す図である。図中、各ドメインの領域はUT I のアミノ酸番号で示した。

図19は、pHH305の構築工程およびその制限酵素地図を示す図である。

図20は、pHH313の制限酵素地図を示す図である。

図21は、pHH306の構築工程およびその制限酵素地図を示す図である。

図22は、pHH314の制限酵素地図を示す図である。

図23は、精製Intact-rUTIのHPLC-GPCのプロファイルを示す図である。

図24は、精製rD2のHPLC-GPCのプロファイルを示す図である。

図25は、mutagenic primerに用いた領域を示す図である。

図26は、pHH334の構築工程を示す図である。

図27は、Ep1-UTI、天然型UTIのクロラミンT酸化の好中球エラスターゼ阻害に対する影響を示す図である。

図28は、UTIのKunitz型ドメイン1のN末端側に付加された21アミノ酸領域をコードする5'末端からEco52Iサイトまでの領域に相当する合成DNAの塩基配列を示す図である。図中、□で囲んだ塩基は、PvuIIサイト消失のために置換された塩基である。

図29は、pHH336の構築工程およびその制限酵素地図を示す図である。

図30は、pHH339の構築工程およびその制限酵素地図を示す図である。

## 〔発明の詳細な説明〕

以下、本発明を詳細に説明する。なお、本明細書および図面において使用する略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。

まず、本発明でいうUTIおよびそのKunitz型ドメインについて説明する。UTIは当初、ヒト尿中よりプロクシュ (Proksch)等の方法 (Proksch G. J. 等、J. Lab.Clin. Med., 79 巻、491-499 頁、1972年) に準じて分離・精製された蛋白性のプロテアーゼインヒビターであり (須見等、日本生理誌、39巻、53-58 頁、1977年)、さらに Watcher, E 等の研究により図1に示す一次構造を有することが知られている (Watcher, E and Hochstrasser, K., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1351, 1981)。尚、図1に示すタンパクの一次構造は、精製されたタンパクから直接求められたアミノ酸配列である。

当該UTIは、2つの構造的に関連するKunitz型ドメインから連続してなる。すなわち、UTIにおいては、一方のKunitz型ドメイン1はUTIのN末端側領域に位置し、N末端から数えてアミノ酸残基22～77として定義されるものであり、もう一方のKunitz型ドメイン2はUTIのC末端側領域に位置し、N末端から数えてアミノ酸残基78～143として定義されるものである (Hochstrasser, K. 等、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1351, 1981)。

尚、DNA組換え法 (cDNA配列からアミノ酸配列を推定) によると、本発明でいうUTIのKunitz型ドメイン1及びKunitz型ドメイン2はそれぞれ図2にて示されるアミノ酸配列を有することが報告されている (J. F. Kaumeyer等, Nucl. Acids Res. 14(20), p7844-7845, 1986; アミノ酸番号86, 87 及び138 位がタンパクから直接求められたアミノ酸配列 (図1) と相違する)。本発明でいうKunitz型ドメイン1およびKunitz型ドメイン2とは、実質的にこれらのドメインをそれぞれ意味する。また、このDNA組換え法によれば、UTI構造遺伝子は441塩基からなり147アミノ酸をコードしているが、天然型UTIにおいては147位のアミノ酸を末端にもつ配列は報告されてい

い (Hochstrasser, K. 等, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362, 1351, 1981)。よって遺伝子工学的にUTIの発現を行う場合、天然に見られる配列にするのが望ましいと考えられることから、本発明では、145位のアミノ酸をKunitz型ドメイン2のC末端アミノ酸とする。

また、Kunitz型ドメイン1およびKunitz型ドメイン2は、それぞれ異なる特異性のプロテアーゼ阻害活性を有する (Gebhard & Hochstraber, Proteinase Inhibitors, Barrett & Salvesen編, Elsevier, 1986, p.375)。

本発明は、UTIのKunitz型ドメイン1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクター、UTIのKunitz型ドメイン2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクター、及びUTIのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターである。

UTIのアミノ酸配列とは、具体的には次の式Vで示されるアミノ酸配列をいう。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
 Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-  
 Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-  
 Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Met-Gly-Met-Thr-Ser-  
 Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-  
 Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-  
 Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-  
 Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-  
 Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-  
 Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-  
 Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-  
 Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-  
 Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu-  
 Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu- (式V)  
 Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

K u n i t z 型ドメイン1のアミノ酸配列とは、具体的には次の式VIで示され  
 るアミノ酸配列をいい、またK u n i t z 型ドメイン2のアミノ酸配列とは、具  
 体的には次の式III で示されるアミノ酸配列をいう。

Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr- Ser-  
 Ala-Gly-Pro-Cys-Met-Gly-Met-Thr-Ser- Arg-  
 Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala- Cys-  
 Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met- Gly- (式VI)  
 Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys- Glu-  
 Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg

Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val  
 Arg-Gly-Pro-Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-  
 Trp-Ala-Phe-Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-  
 Val-Leu-Phe-Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-  
 Asn-Gly-Asn-Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu- (式III)  
 Cys-Arg-Glu-Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-  
 Gly-Asp-Glu-Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

UT Iのアミノ酸配列をコードするDNAとは、当該DNAを適当な方法にてピキア属酵母に導入し、当該ピキア属酵母を形質転換させたときに、形質転換されたそのピキア属酵母により、UT Iのアミノ酸配列を有する蛋白質を発現せうようなDNAであればいかなる塩基配列を有するDNAであってもよい。Kunitz型ドメイン1のアミノ酸配列をコードするDNAおよびKunitz型ドメイン2のアミノ酸配列をコードするDNAについても同様である。

UT Iのアミノ酸配列をコードするDNAとして、好ましくはその塩基配列の一部として図3乃至図7記載の塩基配列のうち塩基番号661～1095で示される塩基配列を有するDNAである。

Kunitz型ドメイン1のアミノ酸配列をコードするDNAとして、好ましくはその塩基配列の一部として図3乃至図7記載の塩基配列のうち塩基番号724～891で示される塩基配列を有するDNAである。

また、Kunitz型ドメイン2のアミノ酸配列をコードするDNAとして、好ましくはその塩基配列の一部として図3乃至図7記載の塩基配列のうち塩基番号892～1095で示される塩基配列を有するDNAである。

なお、コドンの縮重を考慮するに、本発明でいう上記それぞれのDNAは、UT Iのアミノ酸配列をコードしうるものであれば、図3乃至図7に示される塩基配列中の1つ以上の塩基が他の塩基に置換されたものであってもよい。



上記本発明の発現ベクターは、上記DNAを含有し、かつ当該DNAをピキア属酵母において発現しうるものであれば、その由来等は特に制限されない。

また、当該発現ベクターは、上記のDNAに加えて、当該DNAをピキア属酵母内で発現させるための必要なプロモーター、ターミネーター、相同領域、マーカー遺伝子等を有することが好ましく、さらに加えてシグナルペプチドをコードする塩基配列を有するベクターであることが好ましい。また、宿主中で複製可能な自律性複製配列等を担持していてもよい。上記プロモーター、シグナルペプチドをコードする塩基配列等は、ピキア酵母内で機能する配列であればよい。

プロモーターとしては、AOX1プロモーター〔特開昭63-39584号公報（EP-A-244598）〕、DASプロモーター、変異型AOX2プロモーター〔特開平6-90768号公報（EP-A-506040）〕等を用いることができる。

また、シグナルペプチドとしては、酵母インベルターゼ（SUC2）〔特開昭60-41488号公報（EP-A-127304）〕、 $\alpha$ -ファクター〔特開昭59-198980号公報（EP-A-123289）〕のような酵母由来のもの、HSAのシグナルペプチドまたはその誘導体〔特開平2-167095号公報（EP-A-319641）〕、人工的に創案したシグナル配列〔特開平1-240191号公報（EP-A-329127）〕等を用いることができる。

ターミネーターとしては、AOX1ターミネーター〔特開昭63-39584号公報（EP-A-244598）〕等を用いることができる。相同領域はHIS4〔特開昭61-108391号公報（EP-A-180899）〕、URA3、LEU2、ARG4等が例示される。

マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子や栄養要求性相補遺伝子等が用いられる。抗生物質としてはシクロヘキシミド、G-418、クロラムフェニコール、ブレオマイシン、ハイグロマイシン等が例示される。栄養要求性相補遺伝子としては、HIS4、URA3、LEU2、ARG4等が挙げられる。

本発明の発現ベクターは、簡便にはプロモーター、シグナルペプチドをコードする塩基配列等のUT Iまたはその各K u n i t z型ドメインの発現、産生および分泌に必要な塩基配列を予め有するプラスミドベクターまたはファージベクター等に、上記DNAを常法（例えば、Molecular Cloning、a laboratory manual、Second edition、T.Maniatis等編、Cold Spring Harbor Laboratory、1989年）に従って導入することにより作製することができる。または、発現に必要な塩基配列を化学的に合成し、上記DNAとともにプラスミドベクター等に導入することも可能である。

また、本発明は前述した本発明の発現ベクターで形質転換されたピキア酵母に関する。

当該形質転換体は、スフェロプラスト法（Cregg J.T.等、Mol.Cell.Biol.5、3376-3385頁、1985年）、アルカリカチオン法（Itoh H.等、J. Bacteriol. 153、163-168頁、1983年）等の公知の方法に従って、ピキア属酵母を本発明のベクターで形質転換することにより得られる。

形質転換されるピキア属酵母としては、*Pichia pastoris* GTS 115株（NRR L寄託番号：Y-15851）等が挙げられる。

本発明の形質転換体が、UT Iまたはその各K u n i t z型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質を分泌させるものである場合は、それに導入されるベクターとしては、それらの蛋白質をコードする上記DNAに加えて前述のシグナルペプチドをコードする塩基配列を有するものが好ましい。

本発明の形質転換体であるピキア属酵母は、より好ましくはUT Iまたはその各ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質を産生し、かつ形質転換体外に分泌する性質を有するものである。

また本発明は、上記の形質転換体（ピキア属酵母）を培養することにより、UT Iの少なくとも1種のK u n i t z型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質を産生させ、培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、UT Iの少なくとも1種のK u n i t z型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質の製造方法に

関する。

当該製造方法は、下記 (a) ~ (c) の工程を行うことを特徴とする。

(a) U T I の少なくとも 1 種の K u n i t z 型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する DNA を得る。

(b) (a) で得られた DNA を含有する発現ベクターでピキア酵母を形質転換させて形質転換体を得る。

(c) 該形質転換体を培養して、得られる培養物から、U T I の少なくとも 1 種の K u n i t z 型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質を採取する。

ここで、U T I の少なくとも 1 種の K u n i t z 型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質とは、U T I の K u n i t z 型ドメイン 1 または K u n i t z 型ドメイン 2 のいずれかのアミノ酸配列を少なくとも有する蛋白質を意味する。従って、K u n i t z 型ドメイン 1 または K u n i t z 型ドメイン 2 のアミノ酸配列を有していれば、その N 末端および／または C 末端に他のアミノ酸配列を有していてもよく、また U T I のアミノ酸配列を有する蛋白質も包含される。

形質転換体であるピキア属酵母の培養は、ピキア属酵母を培養するのに用いられる一般的方法、例えば特開平 6 - 2 2 7 8 4 号公報等に記載された方法に準じて行えばよい。

具体的には、培地としては 0 . 0 1 ~ 8 % メタノール含有 Y N B 液体培地 [ 0 . 7 % Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Difco 社) ] および 0 . 0 1 ~ 8 % メタノール含有 Y P 培地 [ 1 % Yeast Extract (Difco 社) 、 2 % Peptone (Difco 社) ] 等が例示される。

また、培養は、通常 1 5 ~ 4 3 ° C ( 好適には 2 0 ~ 3 0 ° C 程度) で 2 0 ~ 3 6 0 時間程度行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

つづいて、当該ピキア属酵母の培養物から、ピキア属酵母によって産生された目的の蛋白質を採取する。産生された蛋白質がピキア属酵母の体外に分泌されない場合は該ピキア属酵母菌体から、分泌される場合はその培養上清から単離することが好ましい。

培養物から目的の蛋白質を採取する方法は、通常蛋白質の精製のために使用されている手段、例えば「生化学実験講座1、タンパク質の化学」（日本生化学会編、1976年、東京化学同人）等の多くの文献等に記載されている方法を参照して実施することができる。

得られた蛋白質は必要に応じてさらに精製することもできる。精製方法としては、塩析法、限外濾過膜法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィー等各種クロマトグラフィーなどが例示される。

また、本発明は、有用なプロテアーゼ阻害活性を有する新規ポリペプチドに関する。

本発明の新規ポリペプチドは、プロテアーゼを阻害する活性を有することの特徴とする。具体的には、トリプシン、エラスターゼ等の膵酵素、好中球エラスターゼ等の炎症関連酵素、プラスミン、ファクターXa、カリクレイン等の凝固線溶系酵素のうち少なくとも1つの酵素に対して阻害活性を示すものである。本発明の新規ポリペプチドとして、好ましくは尿由来の天然型UTIが有する好中球エラスターゼ阻害活性よりも強い好中球エラスターゼ阻害活性を有するものであり、より好ましくは加えてトリプシンに対する阻害活性をも有するものである。

本発明の新規ポリペプチドは、その一次構造を規定するアミノ酸配列の少なくとも一部として、次の式Iのアミノ酸配列を含有するものであれば、上記特徴を有する限り、いかなるアミノ酸配列のポリペプチドであってもよい。

Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-  
Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-  
Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-  
Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn- (式 I)  
Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-  
Cys

すなわち本発明のポリペプチドは、式 I で示されるアミノ酸配列そのもので規定されるポリペプチドであってよいし、また式 I のアミノ酸配列の N 末端および／または C 末端に任意の 1 つ以上のアミノ酸が付加されたポリペプチドであってよい。

例えば、本発明の新規ポリペプチドは、その N 末端側に次の式 VII、式 II または式 VIII で示されるアミノ酸配列を有していてもよい。

Lys-Glu-Asp-Ser (式 VII)

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr- (式 II)  
Lys

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-  
Lys-Lys-Glu-Asp-Ser (式 VIII)

特に、N 末端側に式 II で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、該アミノ酸配列を有することに起因して、該アミノ酸配列をもたないポリペプチドに

比較してその発現量が著しく多いため、組換えDNA技術によって大量に製造できるという点で有用である。

また、本発明の新規ポリペプチドは、そのアミノ酸配列のC末端側に、次の式IIIで示されるアミノ酸配列を有していてもよい。

Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val  
Arg-Gly-Pro-Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-  
Trp-Ala-Phe-Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-  
Val-Leu-Phe-Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-  
Asn-Gly-Asn-Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu- (式III)  
Cys-Arg-Glu-Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-  
Gly-Asp-Glu-Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

このような新規ポリペプチドは、好中球エラスターゼ阻害活性を有するのみならず、トリプシン阻害活性を有するという点で有用である。このようなポリペプチドとしては、例えば、次式(IX)で示されるポリペプチドが挙げられる。

Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-  
Ala-Gly-Pro-Cys-Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-Arg-  
Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-  
Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-  
Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu-  
Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-  
Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-Cys-  
Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-Asp-  
Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-Pro-  
Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-Lys-  
Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu-Tyr- (式IX)  
Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-Glu-  
Leu-Leu-Arg-Phe

さらに、本発明の新規ポリペプチドの好ましい他の例は、次の式IVで示される  
アミノ酸配列を有するポリペプチドである。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
 Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-  
 Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-  
 Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-  
 Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-  
 Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-  
 Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-  
 Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-  
 Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-  
 Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-  
 Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-  
 Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-  
 Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu-  
 Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-  
 Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

(式IV)

当該本発明のポリペプチドは、式IVまたは式IXで示されるアミノ酸配列そのもので規定されるポリペプチドのみならず、式IVまたは式IXでのアミノ酸配列のN末端および／またはC末端に任意の1つ以上のアミノ酸が付加されたポリペプチドをも包含するものである。より好ましくは式IVまたは式IXで示されるアミノ酸配列を有し、かつトリプシン阻害活性及び好中球エラスターゼ阻害活性を有するペプチドであり、その好中球エラスターゼ阻害活性が尿由来の天然型UTIが有する当該活性に比して、顕著に増強されてなるものである。

具体的には好中球エラスターゼに対する阻害活性が $K_i$ 値で $1 \times 10^{-9}$  M以下、より好ましくは $K_i$ 値で $5 \times 10^{-10}$  M以下であるポリペプチドが例示される。

本発明の新規ポリペプチドは、極めて強い好中球エラスターゼ阻害活性を有す



ると共に、組換えDNA技術を用いて大量に製造することができる。特に、N末端側に式IIで示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、発現量が極めて高いという点で有用である。

また、本発明の新規ポリペプチドは、UTIと部分的に共通するアミノ酸配列を有し、また低分子であるために組織浸透性が高く、ヒトに対して抗原性を示さないことが期待される。さらに、必要に応じてそのN末端および／またはC末端に別の機能を有する他のポリペプチドを融合させるなど、融合蛋白質を作製するための材料として有用である。

本発明の新規ポリペプチドは、糖鎖を有していてもよいし、有していなくてもよい。また、その取得の由来は特に制限されない。例えば、ペプチド合成機等を使用して化学的に合成されたものであってもよい。好ましくは、組換えDNA技術を使用して作製されたポリペプチドである。より好ましくは酵母もしくはピキ属酵母、または大腸菌を宿主とした組換えDNA技術により産生されたポリペプチドである。また、当該ポリペプチドは、特定の活性に実質的な低下を与えない限り、化学的な修飾（例えば糖付加、アルキル化等）を受けていてもよい。さらに、薬理学的に許容されうる酸または塩基との塩やポリエチレングリコール等のポリマーとの複合体を形成させて得られる物質等も本発明の新規ポリペプチドの態様に含まれる。

また、本発明は上記新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAに関する。当該DNAは式I、式IVまたは式IXのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはそれらのアミノ酸配列のN末端および／またはC末端に他のアミノ酸またはペプチド等（例えば式II, VII, VIII または式III 等で示されるアミノ酸配列を有するもの）を配してなるポリペプチドのアミノ酸配列に変化を生じさせない範囲であれば、いかなる塩基配列であってもよい。

具体的には、式Iで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号736～888で示される塩基配列の塩基番号766～780の塩基が、

ATCGCTTTCT TTCCT

に置換された塩基配列を有するDNAが例示される。式IXで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号724～1095で示される塩基配列の塩基番号766～780の塩基が、

ATCGCTTTCT TTCCT

に置換された塩基配列を有するDNAが例示される。また、式IVで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号661～1095で示される塩基配列の塩基番号766～780の塩基が、

ATCGCTTTCT TTCCT

に置換された塩基配列を有するDNAが例示される。

また、式IIで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号661～723で示される塩基配列を有するDNA、式VIIで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号724～735で示される塩基配列を有するDNA、式VIIIで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号661～735で示される塩基配列を有するDNA、式IIIで示されるポリペプチドをコードするDNAとしては、図3乃至図7に示される塩基配列のうち、5'側から塩基番号892～1095で示される塩基配列を有するDNAが例示される。

また、1つのアミノ酸に対して複数のコドンが対応することを考慮し、本発明のDNAには、それぞれ上記の図3乃至図7で特定される塩基配列において、上記置換が成された塩基配列のうち1つ以上の塩基が他の塩基で置換された塩基配列を有するものをも包含される。

また、本発明のDNAは、上記図で特定される塩基配列に加えてその5'末端

および／または 3' 末端に任意の一つ以上の塩基が付加されたものであってもよい。付加される塩基は、上記塩基配列に付加されることにより、付加される側の塩基配列がコードするアミノ酸配列に変化を生じさせない範囲であれば、いかなる塩基、塩基配列であってもよい。

1 例として、5' 末端に付加される塩基配列としては、開始コドンである塩基配列 A T G 等が挙げられ、また 3' 末端に付加される塩基配列としては、終止コドンである T A A、T A G もしくは T G A 等が挙げられる。

また、本発明の DNA は、本発明の新規ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列の 5' 末端および／または 3' 末端に、他のアミノ酸やポリペプチドをコードする塩基配列を有していてもよい。

本発明の DNA はいかなる方法で得られたものであってもよい。例えば、図 3 乃至図 7 に示された塩基配列を参考にして化学的に合成する方法、適当な染色体 DNA ライブラリーや c DNA ライブラリー等を材料として、組換え DNA の技術を用いて得る方法がある。

本発明の DNA を化学合成するには、例えば次のように行う。本発明の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有する所望の DNA を設計し、必要があれば設計した DNA を適当な断片に分割して、各断片に相当するオリゴマーを全自動 DNA 合成機（例えば、3 8 1 A 型、アプライドバイオシステムズ社製）を用いて化学合成する。

一方、組換え DNA 技術を用いて本発明の DNA を得る方法としては、適当な c DNA ライブラリー、染色体 DNA ライブラリー、または式 I 又は式 IV 等に示されたアミノ酸配列をコードする DNA 等を材料に部位特異的突然変異法（以後、Site-directed mutagenesis という、Kramer, W 等、Nucleic Acid Res., 12 巻、9441—9456 頁、1984 年および Kunkel, T. A. 等、Methods in Enzymology、15 4 巻、367-382 頁、1987 年参照）や P C R 法等の公知の方法で塩基配列の改変と DNA の増幅を行う方法が例示される。

また、本発明は前述の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA

を含有することを特徴とするベクターに関する。

当該ベクターは、上記本発明の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するものであれば、その由来は限定されない。例えばpBR322、pUC18、pUC19等の各種プラスミドベクター、λgt10、λgt11等のファージベクター等の適当な位置に本発明のDNAが導入されたものが挙げられる。好ましくは、使用する宿主細胞内で複製可能なベクターあるいは宿主染色体に組み込み可能なベクターであり、より好ましくは、大腸菌または酵母、好ましくはピキア属酵母内で複製可能な、もしくはそれらに組み込み可能なベクターである。

本発明のベクターは、本発明の新規ポリペプチドをコードするDNAに加えて本発明の新規ポリペプチドを宿主内で発現させるための必要なプロモーターや任意のリボゾーム結合部位等の塩基配列を有することが好ましく、特に、本発明のベクターが分泌発現用ベクターである場合には、さらに加えてシグナルペプチドをコードする塩基配列等を有するベクターが好ましい。上記プロモーター、リボゾーム結合部位、シグナルペプチドをコードする塩基配列等は、使用する宿主内で機能する配列であればよい。プロモーターおよびシグナルペプチドとしては、前述のものが挙げられる。

本発明のベクターは、簡便にはプロモーター、リボゾーム結合部位、シグナルペプチドをコードする塩基配列等の本発明の新規ポリペプチドの発現、産生および分泌に必要な塩基配列を予め有するプラスミドベクターまたはファージベクター等に、本発明のDNAを常法（例えば、Molecular Cloning、a laboratory manual、Second edition T. Maniatis 等編、Cold Spring Harbor Laboratory、1989年）に従って導入することにより作製することができる。または、発現に必要な塩基配列を化学的に合成し、本発明のDNAとともにプラスミドベクターまたはファージベクター等に導入することも可能である。

また、本発明は、前述の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有することを特徴とするベクターで形質転換された形質転換体に関する。

当該形質転換体は、塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、ハナハン(Hanahan, D 著、Techniques for Transformation of E.coli. In: DNA cloning vol 1. Glover, D. M. (ed.) 109-136 頁、IRL press、1985年)等の公知の方法に従って、適当な宿主細胞を本発明のベクターで形質転換することにより得られる。

宿主細胞として酵母を用いる場合は、スフェロプラスト法(Hinnen A. 等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75、1929-1933、1978年、Cregg J.T. 等、Mol.Cell.Biol. 1.5. 3376-3385頁、1985年)、アルカリカチオン法(Itoh H. 等、J. Bacteriol. 153. 163-168頁、1983年)等の公知の方法を用いることができる。

本発明の形質転換体は、より好ましくは本発明の新規ポリペプチドを産生し、かつ形質転換体外に分泌する性質を有するものである。

本発明の形質転換体が、本発明の新規ポリペプチドを形質転換体外に分泌させるものである場合は、導入されるベクターとしては、本発明のDNAに加えてシグナルペプチドをコードする塩基配列を有するものが好ましい。

用いられる宿主細胞としては、本発明のポリペプチドの発現・産生に適したものであれば、酵母等に代表される真核生物細胞であっても大腸菌、枯草菌等に代表される原核生物細胞であってもよい。好ましくは、大腸菌および酵母であり、より好ましくはピキア属酵母である。

さらに本発明は、前述の形質転換体を培養し、本発明の新規ポリペプチドを産生させ、得られる培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする本発明の新規ポリペプチドの製造方法である。

当該製造方法は、下記(a)～(c)の工程を行うことを特徴とする本発明の新規ポリペプチドの製造方法である。

- (a) 本発明の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを得る。
- (b) (a)で得られたDNAを含有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換させて形質転換体を得る。
- (c) 該形質転換体を培養して、得られる培養物から本発明の新規ポリペプチドを採取する。

形質転換体の培養は、微生物または動物細胞を培養するのに用いられる一般的方法、すなわち「生物化学工学」（合葉修一等著、1976年、東京大学出版会）あるいは「組織培養」（中井準之助等編、1976年、朝倉書店）などに記載された方法に準じて行えばよい。

つづいて、当該形質体の培養物から、形質転換体によって産生された本発明の新規ポリペプチドを採取する。産生されたポリペプチドが形質転換体の体外に分泌されない場合は該形質転換体から、分泌される場合はその培養上清から単離することが好ましい。ポリペプチドの採取並びに精製方法は、前述したように常法に従って行うことができる。

また、本発明は、プロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドを、形質転換体で大量に発現させるための発現増強方法に関する。本発明者等は、上述したように、N末端側に式IIで示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、N末端側に式IIに示されるアミノ酸配列をもたないポリペプチドよりも、酵母による発現量が著しく多いことを見出した。従って、好中球エラスターゼ、トリプシン等のプロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドのN末端側に式IIで示されるアミノ酸配列を結合させて、該ポリペプチドを、N末端側に式IIで示されるアミノ酸配列が付加された形で発現させることにより、プロテアーゼインヒビターとして有用なポリペプチドを多量に得ることができる。すなわち、プロテアーゼ阻害活性部位を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'末端側に、式IIで示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を結合したベクターを作成し、このベクターを用いることによって、プロテアーゼインヒビターとして有用なポリペプチドの、形質転換体における発現が増強され、多量のプロテアーゼインヒビターを得ることができる。プロテアーゼ阻害活性部位のアミノ酸配列と式IIのアミノ酸配列との間に、1以上のアミノ酸が配される構成としてもよい。

N末端側に式IIで示されるアミノ酸配列をN末端側に付加しうるポリペプチドとしては、上述した式Iまたは式IXに示されるアミノ酸配列を有する本発明の新規ポリペプチドに限られず、好中球エラスターゼ、トリプシン等のプロテアーゼ

阻害活性を有する他のポリペプチドにも応用が可能であるため、本発明の発現増強方法は極めて有用である。

本発明によれば、ピキア属酵母を宿主細胞とすることを特徴とする遺伝子工学的手法によるUTIおよびその各Kunitz型ドメインの製造方法、およびこれに関連する発現系を提供することができる。本発明のUTIまたはその各Kunitz型ドメインをコードするDNAを含有する発現ベクター、および該ベクターで形質転換されたピキア属酵母からなる発現系、およびそれを用いるUTIおよびその各Kunitz型ドメインの製造方法は、UTIおよびその各Kunitz型ドメインの簡便且つ効率的な量産を可能とする。また、当該系を用いることにより、UTIおよびその各Kunitz型ドメインの変異体または誘導体を容易に作製することができるので、構造活性相関の研究による有用なプロテアーゼ阻害剤の開発等新たな医薬品の開発に寄与し得る。

また、本発明は、一以上のプロテアーゼ阻害活性を有し、かつ尿由来UTIより好中球エラスターゼ阻害活性の優れた有用な新規ポリペプチド、好ましくは優れた好中球エラスターゼ阻害活性を有し、かつ遺伝子工学的手法において発現量が多く、大量に製造可能な有用な新規ポリペプチド、およびその遺伝子工学的手法による該ポリペプチドの製造方法を提供することができる。

本発明のプロテアーゼインヒビターの発現増強方法によれば、プロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドの酵母による発現量を著しく増加させることが可能である。当該増強方法は、本発明の新規ポリペプチド以外のプロテアーゼインヒビター活性を有するポリペプチドに対しても適用し得る点で極めて有用である。

以下、本発明をより一層明確にするために実施例をもって説明する。しかしこれらは、本発明の一態様であり、これらにより本発明はなんら限定されるものではない。また、以下に示す実施例中の諸操作は、下記の雑誌、成書を参考として実施した。

1. ラボマニュアル遺伝子工学、村松正實著、1989年、丸善株式会社
2. 遺伝子操作実験法、高木康敬編著、1980年、講談社
3. 遺伝子操作マニュアル、高木康敬編著、1982年、講談社
4. Molecular Cloning, a laboratory manual, Second edition, T. Maniatis 等編、1989年、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー
5. Methods in Enzymology、65巻、L. Grossman 等編、1980年、Academic Press
6. Methods in Enzymology、68巻、R. Wu 編、1979年、Academic Press

#### 実施例1 ピキア属酵母でのUTIの発現

##### (1) UTIのcDNAのクローニング

##### ①プローブの調製

J.F. Kaumeyer等により報告されたUTIcDNAの塩基配列(Nucl. Acids Res. 14(20), p7839-7850, 1986)のうち、2つのインヒビタードメインをコードする領域に注目し、40塩基前後の長さでGC含量が50%以上になるようプローブ1及び2を設計した。各プローブの領域を下記に示す。

	796	837
・プローブ1	GGTACATCCA TGGCCTGTGA GACTTTCAG TACGGCGGCT GC	
	1048	1089
・プローブ2	GAGTACTGCG GTGTCCCTGG TGATGGTGAT GAGGAGCTGC TG	

この配列を基にして0.2  $\mu$ M FODカラム(アプライドバイオシステムズ・ジャパン社製)を用いて、オリゴヌクレオチドをDNA合成機(モデル392、アプライドバイオシステムズ・ジャパン社製)で合成した。

合成されたオリゴヌクレオチドを、OPCカートリッジ(アプライドバイオシス



テムズ・ジャパン社製)を用いて精製した後、7M尿素10% アクリルアミド変性ゲルで泳動した。その結果、両プローブとも単一のバンドが見られた。

これらのオリゴヌクレオチドを $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP で末端標識した。標識は、100ng のオリゴヌクレオチドと4.6MBqの $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP とを混合し(モル比で1:5)、T4 polynucleotide kinase (宝酒造製)を用いて常法に従って反応させることにより行った。

## ② スクリーニング

### (a) 一次スクリーニング

ヒト肝由来cDNA  $\lambda$ gt10ライブラリー(クローンテック社製)のファージ液を $4.2 \times 10^5$  pfu/mlとなるようにSM緩衝液(100mM NaCl, 10mM  $\text{MgSO}_4$ , 50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.001% ゼラチン)で希釈し、その100  $\mu\text{l}$  と希釈指示菌液とを混合した後、混合液をTB10 bottom agarプレート(1.5% agar/TB10培地、 $\phi$  15cm)に重層し、37°Cで約7 時間インキュベートした。

なお、希釈指示菌液は次のようにして調製した。

E. coli C600 hfl株を5 ml L培地に植菌し、37°Cで9時間培養した。これを2 Lコルベンに分注した500 ml TB10培地に全量植菌し、37°Cで一晩培養した。培養液の600 nmにおける濁度を測定した後集菌し、得られた菌体を10 mM  $\text{MgSO}_4$  水溶液で洗浄後、25 mlの10 mM  $\text{MgSO}_4$  水溶液に懸濁し(濁度 $\text{OD}_{600} = 31.2$ )、さらに10 mM  $\text{MgSO}_4$  水溶液で $\text{OD}_{600} = 2$ に希釈して使用した。

プラークが確認できるようになった時点で培養を止め、マスタープレートとして4°Cに保存した。マスタープレート当たり2枚のメンブレン(colony/plaque screen, デュボン社製)を調製した。得られたメンブレンをTB10 bottom agarプレート上で37°C一晩インキュベートし、ファージの増幅を行った。これらのメンブレンを0.5N水酸化ナトリウム水溶液に5分間浸たし、アルカリ変性処理した。同様の操作を繰り返した後、濾紙で菌体残渣を除去した。その後、1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)に浸して中和し、2  $\times$  SSC 緩衝液でリンスした。これらを濾紙上

で風乾した後、プレハイブリダイゼーション溶液(2×SSC, 2% SDS, 5×Denhardt's soln., 500 μg/ml yeast tRNA)中で60°C 4 時間インキュベートした。

プレハイブリダイゼーション後、メンブレンを新たなバッグに移し換え、各プローブのハイブリダイゼーション溶液(2 ×SSC, 2% SDS, 5×Denhardt's soln., 100 μg/ml yeast tRNA , 末端標識された各プローブを含む溶液を加熱急冷処理したもの)を加えた後、40°C一晩ハイブリダイゼーションした。

その後、メンブレンを2 ×SSC-2% SDS水溶液で室温20分間, 2×SSC-2% SDS水溶液で52°C20分間, さらに1 ×SSC-2% SDS水溶液で45°C40分間洗浄した後、各メンブレンをサララップ(登録商標)で被い、-80°Cで一晩感光した。

シグナルを確認した結果、各メンブレンとも30～40の特異的シグナルがあり、全体で約400 個のシグナルが得られた。ほとんどのシグナルがプローブ1 及び2 で一致していた。

#### (b) 二次スクリーニング

一次スクリーニングに使用したマスタープレートからプローブ1 及び2 でシグナルが一致した10スポットのtop agarose を剥がし取り、0.5ml SM緩衝液に入れ細かく砕いた後、クロロホルムを1 滴を加え4 °Cに2.5 時間放置してファージの溶出をおこなった。ファージ溶出液の濃度を $1 \times 10^7$  pfu/mlと仮定して、SM緩衝液で $5 \times 10^3$  ,  $1 \times 10^3$  ,  $5 \times 10^2$  pfu/mlの3 段階に希釈した。これらファージ希釈液100 μl と希釈指示菌液100 μl とを混合し、37°C20分間インキュベートした。3ml TB10 top agaroseを加え、予め37°Cに保温しておいたTB10 bottom agarプレート(φ9cm)に重層し、37°C一晩インキュベートしたところ、 $5 \times 10^2$  pfu/mlに設定した希釈系でも $10^3-4$  pfu/mlのブランクが観察された。従って、次のメンブレンの調製には、主に $5 \times 10^2$  pfu/mlに設定した系を使用した。

一次スクリーニングと同様に、メンブレン上で37°C6 時間ファージの増幅をおこない、4 °Cに保存した。メンブレンをアルカリ変性, 中和処理, 及び2 ×SSC リンスした後、プレハイブリダイゼーション溶液(2×SSC, 2% SDS, 5×Denhardt's soln., 100 μg/ml yeast tRNA)中で60°C6 時間インキュベートした。

プレハイブリダイゼーション後、プローブ2を用いて一次スクリーニングと同様にハイブリダイゼーションした。各メンブレンを1×SSC-2% SDS水溶液で室温10分間の条件にて、2回洗浄した。その後、各メンブレンをサララップ（登録商標）で被い、室温で6時間感光した。

これを現像した結果、シグナルの観察されたスポットについて三次スクリーニングに供した。

#### （c）三次スクリーニング

二次スクリーニングに使用した各マスタープレートからシグナルに相当するブランクを爪楊枝で指示菌プレート（100μl 希釈指示菌液と3ml TB10 top agaroseとを混合し、予め37°Cに保温しておいたTB10 bottom agarプレートに重層してなるもの）に植菌した。これを37°C一晩インキュベートした。

メンブレン上で37°C3時間ファージの増幅をおこない、アルカリ変性、中和処理、及び2×SSC リンスをおこなった後、プレハイブリダイゼーション溶液を加え、60°Cで2.5時間インキュベートした。

プレハイブリダイゼーション後、プローブ1を用いて一次スクリーニングと同様にハイブリダイゼーションした。

各メンブレンを1×SSC-2% SDS水溶液で室温10分間の洗浄後、サララップ（登録商標）で被い、室温で6時間、増感用スクリーンを用いて感光した。

現像の結果、純化したと考えられるファージクローンを各スポットあたり1～5株得ることが出来た。

#### （d）サブクローニング

得られたファージクローン16株からファージDNAを調製し、得られたファージDNAを制限酵素EcoRI消化後1%アガロースゲル電気泳動してインサートの確認をおこなった。ほとんどのファージクローンに0.5～2kbの大きさをもつインサートがひとつないし二つ認められた。更に、プローブ2を用いたサザンハイブリダイゼーションを行い、文献（J. F. Kaumeyer等, Nucl. Acids Res. 14(20), p 7839-7850, 1986）に報告されている1.2～1.3kbのインサートをもつ6クロー

ンからcDNAを切り出し、pUC19 のEcoRI 部位にサブクローニングした。

制限酵素マッピングをおこない、得られたプラスミドDNA を用いて塩基配列を確認した。

#### (e) 塩基配列の確認

[ $\alpha$ -32p]dCTP を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を確認した。具体的にはSequenase ver.2(ファルマシア製) および7-DEAZA Sequencing kit ver.2 (宝酒造社製) を用いて、そのプロトコールに従って行った。

その結果、得られたUT1cDNA の塩基配列は、Kaumyer 等の報告している配列 (J.F.Kaumeyer等, Nucl. Acids Res. 14(20), p7844-7845, 1986) と全く同じであった (図3～図7)。

以下、得られたサブクローニング株のうち、UT1cDNAの全塩基配列が確認されたNo. 7株を用いて操作を行った。

#### ③UT1cDNAのカセット化

実施例1(1)で得られたUT1cDNA の塩基配列を検討したところ、塩基番号660位のGをCに置換することで新たに制限酵素Aor051HIサイトが生じることが判明した (塩基番号はKaumyer 等の報告に従った)。Aor051HIサイトが生じたことによって天然型UT1 のN末端に相当する部分で遺伝子を開裂でき、今後の発現系構築において非常に有効であると考えられた。また、UT1 構造遺伝子は441塩基からなり147アミノ酸をコードしている。一方、天然型UT1 のC末端アミノ酸は主にLeu143であり、Arg144またはPhe145をもつ配列の存在も報告されているが (Hochstrasse K.等, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, p1123-1230, 1984)、Asn147をC末端にもつ配列は報告されていない。従って遺伝子工学的にUT1の発現をおこなう場合、天然に見られる配列にするのが望ましいと考えられることから、Phe145をC末端アミノ酸にすることにした。以上の点に考慮してUT1cDNAのカセット化を行った。

上記の改変に対応したUT1遺伝子の5'末端および3'末端領域の合成DNA (図8)をDNA合成機 (アプライドバイオシステムズ・ジャパン社製、model

392) で作成した。合成DNA はアニール後両端が各制限酵素接着末端になるように設計した。また、C末端をコードする領域に対応した合成DNA は、C末端の2アミノ酸に対応した6塩基の欠失ならびに操作上の点から3' 非翻訳領域中の21塩基を欠失した配列にした。

一方、サブクローニング株No.7のプラスミド#7に含有されるUT I c DNAの塩基番号504 位にてBbeIで消化し平滑末端に修復した後、更にEcoRI 消化して得られたUT I c DNA を含むDNA 断片をpUC19 のSmaI-EcoRI領域にサブクローニングした(#7/BbeI-ERI、図9)。この#7/BbeI-ERI をもとに各合成DNA の組込みをおこなった。

N末端をコードする領域(以下、N末コード領域という)の置換をおこなうために、#7/BbeI-ERI をBamHI およびEcoRI で消化し、UT I c DNA を含むDNA 断片を回収した。これをUT I c DNAの塩基番号686 位のSau3AIで消化してSau3AI-EcoRI断片を回収した。また、#7/BbeI-ERI をUT I c DNA塩基番号645 位のAvaIおよびEcoRI で消化してベクター部分を回収した。得られた両DNA 断片及び合成DNA を連結し、N末コード領域が改変されたクローンpUTI-Nを得た(図10)。

C末端をコードする領域(以下、C末コード領域という)の置換をおこなうために、#7/BbeI-ERI をUT I c DNAの塩基番号877 位のPstIおよびEcoRI で消化してUT I c DNAの後半部分を含むDNA 断片を回収した。これをUT I c DNAの塩基番号1089位のHhaIで消化してPstI-HhaI 断片を回収した。また、#7/BbeI-ERI をPstIおよびUT I c DNAの塩基番号1146位のSmaIで消化してベクター部分を回収した。得られた両DNA 断片及び合成DNA を連結し、C末コード領域が改変されたクローンpUTI-Cを得た(図11)。

次に、pUTI-NをPstI消化してpUC19 由来のPstIサイトとUT I c DNAの塩基番号877 位のPstIサイトの間のDNA 断片を回収した。これをpUTI-CのPstIサイトに連結し、N末コード領域及びC末コード領域が改変されたクローンpUTI N-Cを作成した(図12)。このプラスミドをAor51HI-SmaI消化することにより3' 非翻

訳領域のポリA配列が除去されたUT1cDNAを得ることができる。

(2) 発現プラスミドpHH310の作成(図14)

ピキア属酵母の発現プラスミドであるpAO807N〔特開平2-104290号公報(E P-A-0344459)〕は、クローニングサイトにEcoRI部位を持つ。これに対応させるため、カセット化UT1cDNAを担持するプラスミドpUT1 N-CをSmaI消化してCIP(calf intestine alkaline phosphatase:宝酒造社製)処理し、EcoRIリンカー(宝酒造社製)を連結し、これでコンピテントセルE. coli HB101を常法により形質転換してプラスミドpUT1 N-C/ERIを作成した(図13)。このプラスミドをAor51HIおよびEcoRIで消化することにより3'非翻訳領域のポリA配列が除去されたUT1cDNAを得ることが出来る。

UT1の発現系構築用に調製した酵母SUC2シグナルペプチドに対応したDNA(Chang C. N. 等, Mol. Cell. Biol. 6, p1812-1819, 1986)をアニーリングした後、T4 kinaseを用いてリン酸化した。このDNAはその5'末端をEcoRI連結末端に、3'末端を平滑末端になるように設計されており、またピキア属酵母のcodon usageに従って一部の塩基配列が改変されている(図15参照)。次に、pUT1 N-C/ERIをAor51HI及びEcoRIで消化し、UT1遺伝子を含む約0.4kbのDNA断片を回収した。ちなみに、このDNA断片は、5'の末端が天然型UT1のN末に対応し、SUC2シグナルと直接連結できる。また、このDNA断片は、図8に示す改変に加えて3'非翻訳領域のポリA配列が除去されている。

以上、5'末端にEcoRI接合部位を有するように調製した合成SUC2シグナル遺伝子、pUT1 N-C/ERIをAor51HIおよびEcoRIで消化して得られた約0.4kbのDNA断片、ならびにEcoRI消化pAO807Nの3つのDNA断片を混合し、連結した後、先と同様にコンピテントセルE. coli HB101を形質転換した。得られた形質転換体から常法によりプラスミドDNAを調製し、制限酵素処理並びにAOX1プロモーター・SUC2

シグナル・UT I 遺伝子の連結領域、及びUT I 遺伝子・AOX 1 ターミナーの連結領域の塩基配列を確認し、ピキア属酵母の発現ベクターである当該プラスミドをpHH310と命名した(図14)。

### (3) 発現株の作成およびその性状

pHH310を選択マーカーであるHIS4上の制限酵素StuIサイトで線状化した後、ピキア属酵母 *Pichia pastoris* GTS115株を、その染色体のhis4遺伝子座を標的にスフェロプラスト法(Cregg J. T. 等, Mol. Cell. Biol. 5, p3376-3385, 1985)に従った挿入型組み込みにより形質転換した。

得られた形質転換体を5ml のYNB 培地(0.7% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 2% dextrose)に植菌し、30℃で2日間培養した。これを5ml 2×YP-2%グリセロール培地(2% Yeast Extract, 4% Peptone, 2% glycerol)に10%植菌後、30℃で2日間培養し菌体を増殖させた。これを遠心し(2000rpm, 5分, 常温)、得られた菌体を5ml のYP-2%メタノール培地(1% Yeast Extract, 2% Peptone, 2% methanol)に懸濁し、更に30℃で5日間培養した。

培養液を遠心し(10000rpm, 5分, 4℃)、培養上清を回収した。得られた培養上清について、トリプシン阻害活性及びヒト好中球エラスターゼ阻害活性を参考例2、3記載の方法に従って測定した。その結果、該上清は顕著なトリプシン阻害活性を示すと共に、わずかながらヒト好中球エラスターゼ阻害活性を示した。

### 実施例2 Kunitz型ドメイン1およびKunitz型ドメイン2の発現系構築

UT Iを構成する2つのKunitz型ドメイン(図2)の各々をピキア属酵母で発現するための発現プラスミドを構築した。なお、本実施例においてKunitz型ドメイン1は、本来のKunitz型ドメイン1のN末端に21アミノ酸からなるUT IのN末ペプチドが付加されたポリペプチド、すなわち、Ala1~Arg77からなるポリペプチド(以下、N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1という)として発現させた。

各Kunitz型ドメイン発現プラスミドは、以下のようにして作成した。

## (1) 発現プラスミドの構築

### ①合成DNAの調製

N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1、Kunitz型ドメイン2各々の発現プラスミドを構築するために、まずN末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1のC末コード領域を補う合成DNA（図16）およびKunitz型ドメイン2のN末コード領域を補う合成DNA（図17）を調製した。N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1のC末コード領域合成DNAは、5'にPstI接合末端、3'にEcoRI接合末端を持ち、途中に停止コドン設けた構造とした。Kunitz型ドメイン2のN末コード領域合成DNAは、SUC2シグナルと連結する5'を平滑末端、3'にApaI接合末端を持つ構造にした。また、1塩基置換によりアミノ酸の変化なしに配列中に制限酵素SphI部位が創製されることから、UTlcDNAの塩基番号902（図6参照）のCをAに変更した。この新たに設けられたSphI部位は、Kunitz型ドメイン1とKunitz型ドメイン2との再連結やKunitz型ドメイン2のN末コード領域を改変する場合に有効である。

これらの合成は、図16および図17に記載の配列に基づいて、DNA合成機（アプライドバイオシステムズ・ジャパン製、モデル392）を用いて行った。

### ②N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1の発現ベクターの調製（N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1：UTlcDNAの塩基番号661～891、図3乃至図7参照）

実施例1（2）で構築したpHH310を制限酵素EcoRI及びPstI消化し、（SUC2シグナル+N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1構造遺伝子）を含む断片を切り出した。この断片を図9に示すN末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1のC末コード領域に対応した合成DNAと共にpUC19のEcoRI部位に連結し、分泌型N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1遺伝子ユニット（図18参照）を担持したプラスミドpHH305を得た（図19



）。このpHH305をEcoRI消化して得られた遺伝子ユニットをpAO807NのEcoRI部位に挿入し、N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1発現プラスミドpHH313を作成した（図20）。

③Kunitz型ドメイン2の発現ベクターの調製（Kunitz型ドメイン2：UTICDNAの塩基番号892～1095、図3乃至図7参照）

実施例1（2）で構築したpUTI-N-C/ERIを制限酵素ApaI及びEcoRI消化し、Kunitz型ドメイン2構造遺伝子DNA断片を得た。この断片と図10に示すKunitz型ドメイン2のN末コード領域に対応した合成DNAならびに合成SUC2シグナル遺伝子とをpUC19のEcoRI部位に連結し、分泌型Kunitz型ドメイン2遺伝子ユニット（図18参照）を担持したプラスミドpHH306を得た（図21）。このpHH306をEcoRI消化して得られた遺伝子ユニットをpAO807NのEcoRI部位に挿入し、Kunitz型ドメイン2発現プラスミドpHH314を作成した（図22）。

。

## （2）発現株の作成およびその性状

（1）で作成したN末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1の発現プラスミドpHH313、Kunitz型ドメイン2の発現プラスミドpHH314をStuIサイトで線状化した後、実施例1と同様にピキア属酵母GTS115株を形質転換した。

得られた形質転換体を5mlのYNB培地に植菌し、30℃で2日間培養した。これを5ml 2×YP-2%グリセロール培地に10%植菌し30℃で1日培養した後、終濃度2%になるようにメタノールを添加し、更に30℃で3日間培養した。

培養液を遠心し（10000rpm, 5分, 4℃）、得られた培養上清について、参考例2、3記載の方法に従って、トリプシンおよびヒト好中球エラスターゼに対する阻害活性を調べた。その結果、N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1発現株の培養上清はいずれも阻害しなかった。一方Kunitz型ドメイン2発現株の培養上清は顕著なトリプシン阻害活性を示すと共に、わずかながらヒト好中球

エラスターゼ阻害活性を示した。

本発明で作成した各発現系はプロトタイプであり、今後改良の必要が生じた場合、N末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1のC末コード領域については合成DNAの置き換えに用いたPst Iサイトが利用でき、Kunitz型ドメイン2でも同様にC末コード領域についてはSca Iサイト、N末コード領域では新たに設けたSph Iサイトを利用しておこなうことができる。

またN末ペプチド付加Kunitz型ドメイン1遺伝子をカセット化したpHH305、Kunitz型ドメイン2遺伝子をカセット化したpHH306は、改変型DNAの作成や該改変型DNAを用いたピキア属酵母発現系作成に利用できる。

実施例3 実施例1で遺伝子組換えによって作成したUT I（以下、I n t a c t - r U T Iという）及び実施例2で遺伝子組換えによって作成したUT IのK u n i t z型ドメイン2（以下、r D 2という）のピキア酵母培養上清からの精製と性状分析

（1）培養上清からの精製

I n t a c t - r U T I 産生酵母培養上清は、10 k D カットの限外濾過膜(Filtron OMEGA 10K MINISSETTE 75 SQ FT)で約10倍に濃縮し、50mM Tris, 20mM CaCl<sub>2</sub> 含有溶液 (pH8.0)を用いて透析した。r D 2 産生酵母の培養上清は、終濃度20mMとなるようにCaCl<sub>2</sub> を添加後、1N-NaOH でpH8.0 に調整した。この調整液を Anhydrotrypsin-Agarose カラム(φ1x3.5cm)に添加し、非吸着画分を50mM Tris, 20mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5M NaClで洗浄後、吸着画分を0.2N HCl, 0.2M NaCl で溶出することによりI n t a c t - r U T I およびr D 2 の精製を行った。溶出画分は、I n t a c t - r U T I については蒸留水で十分透析しセントリプレップ10で濃縮後、一方、r D 2 については0.1N NaOH でpH8 付近に調整しセントリプレップ3で濃縮後、それぞれ-80 °Cに保存した。カラムへの添加量はUT I 力価（トリプシン阻害活性、参考例2）として7,700-12,000u であり、Pass画分への活性の移行はI n t a c t - r U T I で1.0-1.7%、r D 2 で10.8-16.2%であった。最終収率はいずれも54.6-67.6%の範囲にあった。なお、尿由来の天然型UT I は、特開平5 - 9 2 0 0 号公報に記載の方法に従って調製した。また、天然型UT I 由来ドメイン2はHochstrasser等の報告〔Hoppe-Seyler's Z. Physiol. chem. 364, p1689-1696, (1983)〕に従い、天然型UT I をトリプシンで限定分解して調製した。

（2）性状の分析

①SDS - P A G E

精製したI n t a c t - r U T I 及びr D 2 をLaemmli 等の方法に準じてSDS - P A G E にかけた。I n t a c t - r U T I の3 クローンは、同様の泳動パターンを示し、かつ還元条件と非還元条件とで泳動パターンに違いは認められな

かった。またrD2の2クローンについても同様であった。Intact-rUTIでは21.3kDにメインバンドを示し、43kD付近にブロードな、19.4kDにシャープなマイナーバンドを示した。rD2では7.3kDに単一バンドを示し、天然型UTI由来のKunitz型ドメイン2とも同じ泳動位置であった。

## ②ゲル濾過クロマトグラフィー

精製Intact-rUTI及びrD2についてゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：東ソーG3000SWXL、溶出液：0.1M 酢酸ナトリウム-0.3M NaCl, pH6.5、ベックマン社ゴールドシステム使用）を行った。図23にIntact-rUTIのHPLC-GPCパターンを、図24にrD2のHPLC-GPCパターンを示す。

## ③N末端アミノ酸配列分析

Intact-rUTIクローンのSDS-PAGEで認められる3本のバンドとrD2の7.3kDのバンドについて、N末端アミノ酸配列分析を行った。結果を表1に示す。

表1  
rUTI及びrD2のN末端アミノ酸配列分析結果

検体		配列
rUTI	43kD	A-V-L-P-Q-E-E-E-G-S-
	21.3kD	A-V-L-P-Q-E-E-E-G-S-
	19.4kD	E-D-S-( )-Q-L-G-Y-S-
rD2		T-V-A-A-( )-N-L-P-I-V-

( )内はアミノ酸分析の対応するクロマトピークがないことを示す。

表1に示した結果を、天然型UTIの一次構造と照らし合わせると、Intact-rUTIの43kDと21.3kDはアミノ酸配列上は完全分子型であり、19.4kDはN末端側の22残基が欠損していることがわかった。またrD2はcDNAの設計どおり、78番アミノ酸以降の配列であることが確認された。

#### ④Ki値の測定

精製Intact-rUTIとrD2のウシ・トリプシン及びヒト好中球エラスターゼに対するKi値を測定した。

なお、Ki値の測定は、下記の方法に従った。

種々の濃度のUTI検体と各酵素とをそれぞれ25℃で10分間反応させた後、基質を2種の濃度で添加し405nmの吸光度を連続的に測定し、反応初速度を求めた。得られた結果からDixonプロットまたはEasson-Stedmanプロット〔J.G. Bieth Bull.europ.Physiopath.resp 1980, 16(suppl.)〕によりKi値を求めた。反応系の緩衝液は、0.1M Tris, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1%トライトンX-100 からなる緩衝液(pH8.0) (以下、緩衝液Aという)とし、基質はトリプシンにはS-2222 (kabi社製)、好中球エラスターゼにはS-2484 (kabi社製)を用いた。

反応条件は、下記の通りである。

ウシトリプシンは20mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1%トライトンX-100含有溶液(pH3.0)で $6.3 \times 10^{-8}$ Mに希釈した。当該ウシトリプシン液20 $\mu$ lに、緩衝液Aで $10^{-8}$ ~ $10^{-9}$ Mに種々濃度希釈したUTI検体80 $\mu$ lを加え、更に緩衝液Aを220 $\mu$ lまたは310 $\mu$ l加えた。25℃で10分間反応後、各反応液に5mMに蒸留水に溶解したS-2222を120 $\mu$ lまたは30 $\mu$ l加え、405nmの吸光度を経時的に測定した。

好中球エラスターゼは、20mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1%トライトンX-100を含む10mM酢酸緩衝液(pH4.5、以下緩衝液Bという)で $5 \times 10^{-8}$ Mに希釈した。希釈した好中球エラスターゼ液20 $\mu$ lに、緩衝液Aを用いて $10^{-5}$ ~ $10^{-9}$ Mの種々濃度に希釈したUTI検体80 $\mu$ lを加え、更に緩衝液Aを240 $\mu$ lまたは290 $\mu$ lを加えた。この混合液を25℃で10分間反応さ

せた後、各反応液に4 mMに25 % DMSO / 蒸留水に溶解したS-2484を100  $\mu$ l または50  $\mu$ l を加え、405 nmの吸光度を経時的に測定した。

Dixon プロットによる結果を表2に、Easson-Stedmanプロットによる結果を表3に示す。

表2

## 精製r UTI と r D2の酵素阻害定数

検体		K <sub>i</sub> (M)
		トリプシン
r UTI	クローン9-2	$1.2 \times 10^{-11}$
	クローン9-7	$1.3 \times 10^{-11}$
	クローン9-8	$1.5 \times 10^{-11}$
r D2	D2-3	$4.5 \times 10^{-12}$
	D2-5	$6.7 \times 10^{-12}$
天然型UTI		$1.0 \times 10^{-11}$

表 3  
精製 r UTI と r D2 の酵素阻害定数

検体	K <sub>i</sub> (M)	
	トリプシン	エラスターゼ
r UTI	クローン9-2	$3.1 \times 10^{-10}$
	クローン9-7	$3.2 \times 10^{-10}$
	クローン9-8	$3.8 \times 10^{-10}$
r D2	D2-3	$4.5 \times 10^{-11}$
	D2-5	$1.7 \times 10^{-10}$
天然型UTI		$3.6 \times 10^{-9}$

表 2 および表 3 に示したように、K<sub>i</sub> 値は、トリプシン阻害に関しては *Intact-rUTI*、*rD2* とともに天然型 *UTI* と同等の値であった。ところが好中球エラスターゼ阻害では、*Intact-rUTI* では天然型 *UTI* に比べて 2～3 オーダー K<sub>i</sub> 値が大きく阻害が弱かった。しかも一般に *Kunitz* 型ドメイン 1 が阻害に関与すると考えられていた好中球エラスターゼに対して、*rD2* も *Intact-rUTI* と同程度の阻害活性を持つことがわかった。なお、対照として用いた天然型 *UTI* は、特開平 5-9200 号公報に記載の方法に従って調製した。

#### 実施例 4 改変型 UTI (Ep1-UTI) 及びそのビキア属酵母発現系の作製

##### (1) Kunitz 型ドメイン 1 遺伝子の改変

UTI の Kunitz 型ドメイン 1 のアミノ酸配列の一部を改変した改変型 UTI を作製した。改変は、Kunitz 型ドメイン 1 の活性部位を含む領域 (Met-Gly-Met-Thr-Ser) を (Ile-Ala-Phe-Phe-Pro) に置換することによって行った。

置換は、U. S. E. mutagenesis kit (ファルマシア社製) を用いた site directed mutagenesis 法により行った。特に述べる以外はキットに添付されたプロトコールに従って操作した。

実施例 2 で作成した pHH305 上に含まれる Kunitz 型ドメイン 1 遺伝子は pUC19 の lacZ 遺伝子の転写方向と逆向きに挿入されている。そこで、mutagenic primer はキットの selection primer と同一鎖上に存在するように設計した。mutagenic primer の配列を図 25 に示す。調製した mutagenic primer の 5' 末端を T4 kinase でリン酸化し、キットのプロトコールに従って site directed mutagenesis をおこなった。なお、selection primer として SspI/StuI selection primer (ファルマシア社製) を用いた。得られたクローンについて塩基配列を確認し、目的の改変が導入された Kunitz 型ドメイン 1 遺伝子を担持したプラスミドを pTK325 とした。

##### (2) 改変 UTI 遺伝子 (Ep1-UTI 遺伝子) のカセット化

得られた pTK325 を EcoRI および PstI で消化して 3' 領域を欠いた N 末ペプチド付加改変 Kunitz 型ドメイン 1 遺伝子断片を回収した。次に pHH306 を SphI および EcoRI で消化して 5' 領域を欠いた Kunitz 型ドメイン 2 遺伝子断片を回収した。そして Kunitz 型ドメイン 1 上の PstI サイトから Kunitz 型ドメイン 2 上の SphI サイト間に相当する合成 DNA を調製した。これら 3 者と EcoRI 消化した pUC19 とを連結し、目的の改変 UTI 遺伝子 (Ep1-UTI 遺伝子) を担持した pTK332 を得た。



### (3) ピキア酵母発現プラスミドの作成

pTK332をEcoRI 消化して得られた分泌型改変UTI 遺伝子ユニットを発現プラスミドpA0807N のEcoRI サイトに連結し、Epl-UTI 発現プラスミドpHH334を作成した(図26)。

### (4) 発現株の作成およびその性状

Epl-UTI 発現プラスミドpHH334を制限酵素StuIで消化し、実施例1および2と同様にピキア属酵母GTS115株を形質転換した。

得られた形質転換体を5mLYNB培地に植菌し、30°Cで2日間培養した。これを5mlの2×YP-2%グリセロール培地に10%植菌し30°Cで2日間培養後、終濃度4%になるようにメタノールを培地に添加し、更に30°Cで5日間培養した。

培養液を遠心して得られた培養上清について、参考例2、3記載の方法に準じてトリプシン阻害活性およびヒト好中球エラスターゼ阻害活性を測定した。その結果、顕著なトリプシン阻害活性を示すとともに、実施例2で示した未改変のIntact-rUTI に比べてヒト好中球エラスターゼ阻害活性の増強が顕著であった。

### (5) Epl-UTIの酵母培養上清からの精製

培養上清3700mlを4°Cで7000rpm、30分間(TOMY No17 Rotor)遠心後、得られた上清を0.45μm膜(MILLIPAK<sup>®</sup> 200ミリポア-MPHL20CA3)で濾過後、10kDカットの限外濾過膜(FILTRON MINISLETTE<sup>™</sup> OS010C01)で750mlに濃縮した。0.45μm膜濾過後の培養上清のUTI力価は25.6u/mlであり、濃縮培養上清は99.2u/mlであった。濃縮培養上清に、終濃度20mMとなるようにCaCl<sub>2</sub>を添加後、1N-NaOHでpH8.0に調整した。この調製液をAnhydrotrypsin-Agaroseカラム(φ2.0×2.2cm)に添加し非吸着画分を50mM Tris, 20mM CaCl<sub>2</sub>含有溶液(pH8.0)及び50mM Tris, 20mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM ベンズアミジン含有溶液(pH8.0)で十分洗浄後、吸着画分を0.2N HCl, 0.2M NaClで溶出した。溶出画分を50mM Tris, 20mM CaC

1.2 含有溶液 (pH 8.0) に透析しセントリプレップ10で濃縮し精製品とした。精製品のUTI力価は2160 u/mlであり、カラム添加力価に対する回収率は50.1%であった。

精製品のSDS電気泳動パターンは、20.9 kDに主バンドを示し、17.1 kDにマイナーバンドを示した。20.9 kDはアミノ酸配列上完全分子型であり、17.1 kDはN末端の22アミノ酸が欠失しており、また、いずれの分子にも糖鎖が付加されていると考えられた。

#### (6) 精製Ep1-UTIの性状分析

##### ① 精製Ep1-UTIの酵素阻害物質定数 ( $K_i$ )

精製Ep1-UTIの各種酵素〔トリプシン (ウシ, ヒト)、プラスミン、好中球エラスターゼ〕に対する $K_i$ 値を下記の方法に従って測定した。

種々の濃度のEp1-UTI検体と酵素とを25℃で10分間反応させた後、基質を2種の濃度で添加し405 nmの吸光度を連続的に測定し、反応初速度を求めた。得られた結果からDixonプロットまたはLineweaver-Burkの2次プロットにより $K_i$ 値を求めた。反応系の緩衝液は緩衝液Aを用い、基質はトリプシンにはS-2222 (kabi社製)、好中球エラスターゼにはS-2484 (kabi社製)、プラスミンにはS-2251 (第一化学薬品社製)を用いた。

反応条件は、それぞれ下記の通りである。

ウシトリプシンは20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% トライトンX-100, pH 3.0で $6.3 \times 10^{-8}$  Mに希釈した。当該ウシトリプシン液20  $\mu$ lに、緩衝液Aで $10^{-8}$  ~  $10^{-9}$  Mに種々濃度希釈したUTI検体80  $\mu$ lを加え、更に緩衝液Aを220  $\mu$ lまたは310  $\mu$ l加えた。25℃で10分間反応後、各反応液に5 mMに蒸留水に溶解したS-2222を120  $\mu$ lまたは30  $\mu$ l加え、405 nmの吸光度を経時的に測定した。

ヒトリプシンは20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% トライトンX-100 含有溶液 (pH 3.0) で $1 \times 10^{-7}$  Mに希釈した。当該ヒトリプシン液20  $\mu$ lに、緩衝液Aで $10^{-8}$  ~  $10^{-9}$  Mに種々濃度希釈したUTI検体80  $\mu$ lを加え

、更に緩衝液Aを220  $\mu$ lまたは310  $\mu$ l加えた。これらを上記ウシトリプシンの場合と同様に処理し、吸光度を測定した。

好中球エラスターゼは、緩衝液Bで $5 \times 10^{-8}$ Mに希釈した。希釈したエラスターゼ液20  $\mu$ lに、緩衝液Aで $10^{-5} \sim 10^{-9}$ Mに種々濃度に希釈したUTI検体80  $\mu$ lを加え、更に緩衝液Aを240  $\mu$ lまたは290  $\mu$ lを加えた。25°Cで10分間反応後、各反応液に4mMに25%DMSO/蒸留水に溶解したS-2484を100  $\mu$ lまたは50  $\mu$ lを加え、405nmの吸光度を経時的に測定した。

プラスミンは、緩衝液Bで $8 \times 10^{-8}$ Mに希釈した。希釈したプラスミン液40  $\mu$ lに、緩衝液Aで $10^{-5} \sim 10^{-9}$ Mに種々濃度に希釈したUTI検体80  $\mu$ lを加え、更に緩衝液A180  $\mu$ lを加えた。25°Cで10分間反応後、各反応液に、5mMまたは2.5mMに蒸留水に溶解したS-2251を100  $\mu$ l加え、405nmの吸光度を経時的に測定した。

表4に精製Ep1-UTIのKi値を、同様に測定したIntact-rUTI及び天然型UTIの値と共に示した。表4中、\*を記した値は、Lineweaver-Burkの2次プロットによって求め、その他の値は、Dixonプロットによって求めた。

表 4

酵素	酵素阻害物質定数 ( $K_i$ : nM)		
	天然型UTI	Intact-rUTI	Epl-UTI
トリプシン (ウシ)	0.21	0.31	0.38
トリプシン (ヒト)	3.9*	6.3*	6.4*
プラスミン (ヒト)	770	460	600
好中球エラスターゼ	3.6	1000	0.57

表 4 に示したように、阻害活性が U T I の K u n i t z 型ドメイン 2 領域に起因すると言われるトリプシンやプラスミンに対しては、 $K_i$  値は天然型 U T I、I n t a c t - r U T I と E p l - U T I とではほぼ同様の値だったのに対し、阻害活性が K u n i t z 型ドメイン 1 に起因すると言われる好中球エラスターゼに対しては K u n i t z 型ドメイン 1 の活性中心に改変を行った E p l - U T I は天然型 U T I よりも 1 オーダー、I n t a c t - r U T I よりも 4 オーダー  $K_i$  値が小さくなり阻害能の上昇が認められた。

## ②酸化感受性の評価

緩衝液 A で希釈された E p l - U T I 溶液 ( $2 \times 10^{-8}$  M) 及び天然型 U T I 溶液 ( $1 \times 10^{-6}$  M) 各  $80 \mu\text{l}$  に、緩衝液 A で 33.3 mM から 1.67 M まで連続 3 倍希釈したクロラミン T (ナカライテスク社製) 溶液を  $120 \mu\text{l}$  添加し、室温で 10 分間反応させた。次いで、各反応液に水に溶解した 100 mM の L - メチオニン (ナカライテスク社製) を  $120 \mu\text{l}$  添加して反応を停止し、緩

衝液Bに溶解した好中球エラスターゼ ( $5 \times 10^{-4}$  M) を  $20 \mu\text{l}$  添加して  $25^\circ\text{C}$  で  $10$  分間反応させた。次に、各反応液に、 $25\%$  DMSO に溶解した  $4\text{mM}$  の S-2484 (kabi 社製) を  $120 \mu\text{l}$  添加し反応初速度を分光光度計 ( $405\text{nm}$ ) で測定した。

図 27 に、クロラミン T によって酸化された E p 1 - U T I 及び天然型 U T I のヒト好中球エラスターゼ阻害に対する影響を示した。図 27 中における残存阻害率は、阻害率をインヒビター非添加時の反応初速度に対するインヒビター添加時の反応初速度の減少の割合 (%) としたとき、クロラミン T 非酸化インヒビターの阻害率に対する、クロラミン T 酸化インヒビターの阻害率の割合 (%) を示している。図 27 に示したように、反応させたクロラミン T の濃度を高くすると、クロラミン T 酸化によって尿由来の天然型 U T I では好中球エラスターゼ阻害活性が低下したのに対して、E p 1 - U T I では該阻害活性は低下しなかった。

以上から、U T I のアミノ酸配列の一部を他のアミノ酸で置換することによって、天然型 U T I、I n t a c t - r U T I と同等のトリプシン阻害活性およびプラスミン阻害活性を保持しながら、好中球エラスターゼ阻害活性については天然型 U T I に比べて 1 オーダー、I n t a c t - r U T I に比べて 4 オーダー増強でき、改変の効果が認められた。

E p 1 - U T I は、尿由来の天然型 U T I の N 末端から 36 位 (図 5 参照) のメチオニンがイソロイシンに、尿由来の天然型 U T I の N 末端から 38 位 (図 5 参照) のメチオニンがフェニルアラニンに置換されており、この置換によって酸化に対する耐性向上が期待される。

クロラミン T は、中性または弱アルカリ性においてメチオニンをメチオニンスルホキシドに酸化することが知られているが、図 27 に示すように E p 1 - U T I の好中球エラスターゼ阻害活性は天然型 U T I に比べてクロラミン T 酸化による影響を受けないことが確認された。炎症場において、好中球はエラスターゼと共に、活性酸素も放出することが知られているが、そのような場においても E p 1 - U T I は、安定して作用することが期待される。

実施例5 N末端21アミノ酸欠失改変型UTI（以下、E p 1 - d 2 1という）及びそのピキア属酵母発現系の作製

（1）E p 1 - d 2 1遺伝子のカセット化

実施例4で得られたpTK332をEco52I及びEcoRIとで消化し、ベクターDNAのEcoRI断片並びにKunitz型ドメイン1のN末端側に付加された21アミノ酸領域をコードする5'末端領域を欠いたUTI遺伝子のEco52I-EcoRI断片とを回収した。

SUC2シグナルは図15に示した合成DNAを使用した。またKunitz型ドメイン1のN末端側に付加された21アミノ酸領域をコードする5'末端からEco52Iサイトまでの領域は、これに相当する合成DNAを本来あったPvuIIサイトを消失させて調製した（図28）。これら4者を連結し、E p 1 - d 2 1遺伝子を担持したプラスミドpHH336を作成した（図29）。

（2）ピキア属酵母発現プラスミドの作成

（1）で得られたpHH336をEcoRI消化して得られたE p 1 - d 2 1遺伝子を発現プラスミドpAO807NのEcoRIサイトに連結し、発現プラスミドpHH339を作成した（図30）。

（3）発現株の作成およびその性状

E p 1 - d 2 1発現プラスミドpHH339を制限酵素StuIで消化し、実施例1および2と同様にピキア属酵母 GTS115株を形質転換した。

得られた形質転換体を5ml YNB培地に植菌し、30℃で2日間培養した。これを5mlの2×YP-2%グリセロール培地に10%植菌し30℃で2日間培養後、終濃度4%になるように培地にメタノールを添加し、更に30℃で5日間培養した。

得られた培養上清は、実施例1で得られた未改変のIntact-rUTI に比べて顕著なヒト好中球エラスターゼ阻害活性を示した。

（4）E p 1 - d 2 1の酵母培養上清からの精製

培養上清2000mlを4℃で9000rpm、30分間（TOMY No9 Rotor）遠心後、得られた上清を0.45μm膜（MILLIPAK<sup>®</sup> 20

0 ミリポア-MPHL 20CA3) で濾過した。濾液を10 kD カットの限外濾過膜 (FILTRON MINISSETTE™ OS010C01) で100 ml に濃縮後、50 mM Tris、20 mM  $\text{CaCl}_2$  からなる溶液 (pH 8.0) 10 L に対して透析した。濃縮後の培養上清のUTI力価は23 u/ml であった。透析後の濃縮培養上清を、Anhydrotrypsin-Agaroseカラム ( $\phi$  2.0  $\times$  2.2 cm) に添加し非吸着画分を50 mM Tris、20 mM  $\text{CaCl}_2$  含有溶液 (pH 8.0) 及び50 mM Tris、20 mM  $\text{CaCl}_2$ 、250 mM ベンズアミジン含有溶液 (pH 8.0) で十分洗浄後、吸着画分を0.2 N HCl、0.2 M NaCl 含有溶液で溶出した。溶出画分を蒸留水を用いて透析しセントリプレップ10で濃縮し精製品とした。精製品のUTI力価は2440 u/ml であった。

精製品のSDS電気泳動パターンは、17.7 kDに主バンドを示した。また糖鎖が付加していると考えられた。

#### (5) 精製E p 1 - d 2 1 の性状分析

##### ① 精製E p 1 - d 2 1 の酵素阻害物質定数 ( $K_i$ )

精製E p 1 - d 2 1 の各種酵素 (トリプシン (ウシ、ヒト)、ヒトプラスミン、ヒト好中球エラスターゼ) に対する $K_i$ 値を求めた。

具体的には、下記の方法に従って $K_i$ 値を求めた。

種々の濃度のE p 1 - d 2 1 検体と酵素とをそれぞれ25°Cで10分間反応後、基質を2種の濃度で添加し405 nm吸光度を連続的に測定し、反応初速度を求めた。得られた測定結果より、Easson-Stedmanプロット [J.G.Bieth Bull.europ. Physiopath. resp 1980, 16(suppl.) 183-195]、Dixon プロットまたはLineweaver-Burk の2次プロットにより $K_i$ 値を求めた。反応系の緩衝液として緩衝液Aを、また基質はトリプシンにはS-2222 (Kabi社製)、好中球エラスターゼにはS-2484 (Kabi社製)、プラスミンにはS-2251 (第一化学薬品社製)を用いた。

反応条件は、下記の通りである。

ウシトリプシンは20 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1% トライトンX-100 含有

溶液 (pH 3.0) で  $6.3 \times 10^{-8}$  M に希釈した。当該ウシトリプシン液  $20 \mu\text{l}$  に、緩衝液 A で  $10^{-8} \sim 10^{-9}$  M に種々濃度希釈した E p 1 - d 2 1 検体  $80 \mu\text{l}$  を加え、更に緩衝液 A を  $220 \mu\text{l}$  または  $310 \mu\text{l}$  加えた。25°C で 10 分間反応後、各反応液に、5 mM に蒸留水に溶解した S - 2 2 2 2 を  $120 \mu\text{l}$  または  $30 \mu\text{l}$  加え、405 nm の吸光度を経時的に測定した。

ヒトリプシンは 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% トライトン X - 100 含有溶液 (pH 3.0) で  $1 \times 10^{-7}$  M に希釈した。当該ヒトリプシン液  $20 \mu\text{l}$  に、緩衝液 A で  $10^{-8} \sim 10^{-9}$  M に種々濃度希釈した E p 1 - d 2 1 検体  $80 \mu\text{l}$  を加え、更に緩衝液 A を  $220 \mu\text{l}$  または  $310 \mu\text{l}$  加えた。これらを上記ウシトリプシンの場合と同様に処理し、吸光度を測定した。

好中球エラスターゼは、緩衝液 B で  $5 \times 10^{-8}$  M に希釈した。希釈した好中球エラスターゼ液  $20 \mu\text{l}$  に、緩衝液 A で  $10^{-5} \sim 10^{-8}$  M に種々濃度に希釈した E p 1 - d 2 1 検体  $80 \mu\text{l}$  を加え、緩衝液 A を  $240 \mu\text{l}$  または  $290 \mu\text{l}$  を加えた。25°C で 10 分間反応後、各反応液に、4 mM に 25% DMSO / 蒸留水に溶解した S - 2 4 8 4 を  $100 \mu\text{l}$  または  $50 \mu\text{l}$  を加え、405 nm の吸光度を経時的に測定した。

プラスミンは、緩衝液 B で  $8 \times 10^{-8}$  M に希釈した。希釈したプラスミン液  $40 \mu\text{l}$  に、緩衝液 A で  $10^{-5} \sim 10^{-8}$  M に種々濃度に希釈した E p 1 - d 2 1 検体  $80 \mu\text{l}$  を加え、更に緩衝液 A  $180 \mu\text{l}$  を加えた。25°C で 10 分間反応後、各反応液に 5 mM または 2.5 mM に蒸留水に溶解した S - 2 2 5 1 を  $100 \mu\text{l}$  加え、405 nm の吸光度を経時的に測定した。

表 5 に各種酵素 (トリプシン (ウシ, ヒト)、プラスミン、ヒト好中球エラスターゼ) に対する精製 E p 1 - d 2 1 の  $K_i$  値を、上記の測定条件下で同様に測定した I n t a c t - r U T I、天然型 U T I 及び E p 1 - U T I の  $K_i$  値と共に示した。表 5 中、\* 1 を記した値は Easson-Stedman プロット、\* 2 を記した値は、Lineweaver-Burk の 2 次プロットによって求め、その他の値は Dixon プロットによって求めた。



表 5

酵素	酵素阻害物質定数 ( $K_i$ : nM)			
	天然型UTI	Intact-rUTI	Epl-UTI	Epl-d21
トリプシン (ウシ)	0.010 <sup>*1</sup>	0.015 <sup>*1</sup>	0.015 <sup>*1</sup>	0.0094 <sup>*1</sup>
トリプシン (ヒト)	3.9 <sup>*2</sup>	6.3 <sup>*2</sup>	6.4 <sup>*2</sup>	0.79 <sup>*2</sup>
プラスミン (ヒト)	770	460	600	990
好中球エラスターゼ	3.6	1000	0.145	0.093

表5に示したように、トリプシンおよびプラスミン阻害に関しては、遺伝子組換えによって作成したUTI (Intact-rUTI、Epl-UTI、Epl-d21) の $K_i$ 値は天然型UTIのそれに対して1/5から1.6倍の範囲にあったが、好中球エラスターゼ阻害に関しては、Epl-UTIで天然型UTIの1/25、Epl-d21で1/39と顕著に $K_i$ 値が小さくなり阻害能の明らかな上昇が認められた。

## ②酸化感受性の評価

50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で5  $\mu$ Mに希釈されたEpl-d21及び天然型UTI各25  $\mu$ lに、同緩衝液で20 mMから1.28  $\mu$ Mまで連続5倍希釈したクロラミンT (ナカライテスク社製) を25  $\mu$ l添加し、室温で20分間反応させた。次いで、各反応液に200 mMのL-メチオニン水溶液を50  $\mu$ l添加して反応を停止して緩衝液Aで $9.4 \times 10^{-8}$  Mに希釈後、その40  $\mu$ lに、緩衝液A110  $\mu$ l、及び緩衝液Bで $2.5 \times 10^{-7}$  Mに希釈したヒト好中

球エラスターゼを  $20 \mu\text{l}$  添加して  $25^\circ\text{C}$  で  $10$  分間反応させた。次に、各反応液に  $25\%$  DMSO に溶解した  $2\text{mM}$  の S-2484 (Kabi 社製) を  $50 \mu\text{l}$  添加し、 $25^\circ\text{C}$  で  $5$  分間反応後、 $20\%$  酢酸溶液を  $70 \mu\text{l}$  加えて反応を止め  $405\text{nm}$  の吸光度を測定した。

表 6 に、E p 1 - d 2 1 及び天然型 U T I においてヒト好中球エラスターゼ活性が  $80\%$  以上残存するクロラミン T の処理濃度を示す。天然型 U T I は比較的 low 濃度で失活する。一方、E p 1 - d 2 1 においては、E p 1 - U T I と同様に天然型 U T I が失活するような low 濃度のクロラミン T による酸化では全く失活せず、明らかに酸化抵抗性の増大が認められた。

表 6

クロラミン処理濃度		
天然型 U T I	<	$3.2 \mu\text{M}$
E p 1 - d 2 1	<	$400 \mu\text{M}$

実施例 6 E p 1 - U T I 発現株および E p 1 - d 2 1 発現株の試験管培養における発現量の比較

実施例 4 (4) で得られた E p 1 - U T I 発現株の培養上清ならびに実施例 5 (3) で得られた E p 1 - d 2 1 発現株の培養上清について、各改変型 U T I の発現量を抗 r U T I 抗体 (参考例 1) によるサンドイッチ E L I S A 法で測定した。なお、発色酵素にワサビペルオキシダーゼアビジン D (VECTOR LABORATORIES 社製)、発色基質にペルオキシダーゼ用発色キット O (住友ベークライト社製) を供給元の推奨に従って使用した。一般的な手順は成書に従った。測定はタイターテックマルチスキャン MCC/340 MKII (Flow Laboratories 社製) で行い、データの解析には  $\Delta$  S O F T (vers. 2.12F, BioMetallics 社製) を用いた。

その結果、E p 1 - U T I 発現株の培養上清中には 1 0 m g / L、E p 1 - d 2 1 の発現株の培養上清中には 0 . 7 m g / L の各改変型 U T I が検出され、2 1 アミノ酸からなる U T I の N 末ペプチドの有無により発現量に 1 4 倍強の差が認められた。また、表 4 に示すように両改変型 U T I の各酵素阻害活性は同等であることから、U T I の N 末ペプチドは酵素阻害活性に影響することなく、遺伝子工学的的手法における発現量の増大に寄与することが示唆された。

#### 実施例 7 高密度フラスコ培養による発現量の比較

実施例 6 において、2 1 アミノ酸からなる U T I の N 末ペプチドをもつ E p 1 - U T I は、それをもたない E p 1 - d 2 1 に比して遺伝子工学的に大量に発現されることが示唆された。これを確認するためにメタノール誘導時の菌体密度を高めた形でのフラスコ培養（高密度フラスコ培養）をおこない、発現量を比較した。

実施例 4（4）で得られた E p 1 - U T I 発現株ならびに実施例 5（3）で得られた E p 1 - d 2 1 発現株を 2 m l の Y N B 培地に植菌して 3 0 ° C で 2 日間培養した。これを 1 0 0 m l の 3 × Y P - 2 % グリセロール培地（3 % Yeast Extract、6 % Peptone、2 % glycerol）に 1 m l ずつ植菌して、3 0 ° C で 2 日間培養後、波長 6 0 0 n m における濁度（O D<sub>600</sub>）を測定した。

培養液から集菌した後、各々の O D<sub>600</sub> 値が 2 5 0 程度になるように 2 × Y P - 4 % メタノール培地（2 % Yeast Extract, 4 % Peptone, 4 % methanol）に懸濁した。これらをバッフル付 300 m l 容三角フラスコに 40 m l ずつ入れ、3 0 ° C で 1 5 0 r p m、7 2 時間培養した。2 4 時間毎に濁度を測定し、また発現量測定用の培養上清を回収して - 2 0 ° C に凍結保存した。

培養終了後、凍結保存しておいた培養上清を室温で自然融解し、各改変型 U T I の発現量を実施例 6 と同様にサンドイッチ E L I S A 法を用いて測定した。各時間毎の濁度および発現量を表 7 に示す。

表 7

Ep1-UTIおよびEp1-d21の高密度フラスコ培養

改変型 U T I	0 hr	24hr		48hr		72hr	
	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub>	発現量 (mg/L)	OD <sub>600</sub>	発現量 (mg/L)	OD <sub>600</sub>	発現量 (mg/L)
Ep1-UTI	295	365	193	329	197	305	236
Ep1-d21	273	353	2.9	337	3.6	318	3.7

Ep1-UTI発現株の培養上清中には236 mg/L、Ep1-d21発現株の上清中には3.7 mg/Lの各改変型UTIが検出された。すなわち、21アミノ酸からなるUTIのN末ペプチドの有無により発現量に63倍の差が認められ、UTIのN末ペプチドが遺伝子工学的手法における発現量の増大に寄与することが、実施例6の試験管培養よりも更に顕著に示される結果となった。

ビキア属酵母を発現系の宿主に用いる利点のひとつに、至適に制御された培養条件のもとで菌体の高密度化が図れることが挙げられる。本実施例に示した菌体の高密度条件下において、21アミノ酸からなるUTIのN末ペプチドをもつEp1-UTI発現株が、それをもたないEp1-d21発現株に比して発現量に著しく優れることは、制御可能な培養槽での培養条件等を検討することで更に発現量の増大が可能なことを示唆するものである。

## 参考例1 アフィニティー精製ポリクローナル抗rUTI抗体の調製

天然型UTIで免疫したウサギ抗血清を硫酸塩析し、Ig画分を回収した。これを天然型UTIをFMP活性化セルロファイン（生化学工業製）に固定したアフィニティーカラムに吸着させ、0.5M NaCl-0.1M トリス（pH 7.0）で洗浄後、0.1Mグリシン塩酸（pH 2.5）で溶出した。また必要に応じて、常法に従ってビオチン化を行った。

## 参考例2 UTI力価（トリプシン阻害活性）の測定方法

約50u/mlに希釈したUTI検体200  $\mu$ l、反応緩衝液(0.1M Tris-HCl, 20mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.5mg/ml Gelatin, pH8.0) 1.6ml、100  $\mu$ g/mlに希釈したウシ・トリプシン200  $\mu$ lを混和し5分間静置後、5mg/mlのL-BAPNa (N- $\alpha$ -Bengoyl-L-Arginine-p-Nitroanilide) 1mlを混和し正確に5分間反応させた後、反応液に20%酢酸を1mlを混和して反応を止め405nmの吸光度を測定した。UTIは反上記緩衝液で希釈し、トリプシンは20mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.5mg/ml Gelatin, pH3.0で希釈した。

### 参考例3 ヒト好中球エラスターゼ阻害活性の測定

緩衝液Aで $9.4 \times 10^{-8}$ Mに希釈したインヒビター溶液40  $\mu$ lに緩衝液Aを110  $\mu$ l加え、緩衝液Bで $2.5 \times 10^{-7}$ Mに希釈した好中球エラスターゼを20  $\mu$ l加え25°C30分間静置した。次に2.0mM S-2484 (Kabi社製) / 25% DMSOを50  $\mu$ l加え25°Cで5分間反応後、20%酢酸溶液を70  $\mu$ l加えて反応を止め405nmの吸光度を測定した。

## 請求の範囲

1. 尿性トリプシンインヒビターのKunitz型ドメイン1のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有するピキア属酵母用発現ベクター。
2. 尿性トリプシンインヒビターのKunitz型ドメイン2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有するピキア属酵母用発現ベクター。
3. 尿性トリプシンインヒビターのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含有するピキア属酵母用発現ベクター。
4. 請求の範囲1～3のいずれかに記載のピキア属酵母用発現ベクターで形質転換されたピキア属酵母。
5. 請求の範囲4に記載のピキア属酵母を培養し、尿性トリプシンインヒビターの、少なくとも1種のKunitz型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質を産生させ、得られる培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、尿性トリプシンインヒビターの、少なくとも1種のKunitz型ドメインのアミノ酸配列を有する蛋白質の製造方法。
6. 少なくとも下記式Iのアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-  
Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-  
Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-  
Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-      (式I)  
Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-  
Cys

7. 下記IIIのアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲6に記載の新規ポリペプチド。

Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val  
Arg-Gly-Pro-Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-  
Trp-Ala-Phe-Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-  
Val-Leu-Phe-Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-  
Asn-Gly-Asn-Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu- (式III)  
Cys-Arg-Glu-Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-  
Gly-Asp-Glu-Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

8. 下記式IXのアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-  
Ala-Gly-Pro-Cys-Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-Arg-  
Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-  
Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-  
Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu-  
Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-  
Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-Cys-  
Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-Asp-  
Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-Pro-  
Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-Lys-  
Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu-Tyr- (式IX)  
Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-Glu-  
Leu-Leu-Arg-Phe

9. N末端側に下記式IIのアミノ酸配列を有することを特徴とする請求の範囲6

～ 8 のいずれかに記載の新規ポリペプチド。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-      (式II)  
Lys

10. 下記式IVのアミノ酸配列を有することを特徴とする新規ポリペプチド。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Ser-  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-  
Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-  
Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Ile-Ala-Phe-Phe-Pro-  
Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-  
Cys-Glu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-  
Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-  
Glu-Cys-Leu-Gln-Thr-Cys-Arg-Thr-Val-Ala-  
Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Arg-Gly-Pro-  
Cys-Arg-Ala-Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-  
Asp-Ala-Val-Lys-Gly-Lys-Cys-Val-Leu-Phe-  
Pro-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gln-Gly-Asn-Gly-Asn-  
Lys-Phe-Tyr-Ser-Glu-Lys-Glu-Cys-Arg-Glu-      (式IV)  
Tyr-Cys-Gly-Val-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Glu-  
Glu-Leu-Leu-Arg-Phe

11. 好中球エラスターゼに対する阻害活性を有する請求の範囲6～10のいずれかに記載の新規ポリペプチド。

12. トリプシンに対する阻害活性を有し、かつ天然型尿性トリプシンインヒビ



ターに比して好中球エラスターゼに対する阻害活性が増強された請求の範囲 6 ～ 10 のいずれかに記載の新規ポリペプチド。

13. 請求の範囲 6 ～ 12 のいずれかに記載の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする DNA。

14. 請求の範囲 13 記載の DNA を含有することを特徴とするベクター。

15. 請求の範囲 14 記載のベクターで形質転換された形質転換体。

16. 請求の範囲 15 記載の形質転換体を培養して、請求の範囲 6 ～ 12 のいずれかに記載の新規ポリペプチドを産生させ、得られる培養物から当該新規ポリペプチドを採取することを特徴とする請求の範囲 6 ～ 12 のいずれかに記載の新規ポリペプチドの製造方法。

17. プロテアーゼインヒビターの活性部位を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列の 5' 末端側に、下記式 (II) のアミノ酸配列をコードする塩基配列が結合されたベクターにて形質転換された形質転換体を培養することを特徴とするプロテアーゼインヒビターの発現増強方法。

Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Ser- (式II)  
Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-  
Lys

〔1996年1月16日（16.01.96）国際事務局受理：出願当初の請求の範囲17は補正された；新しい請求の範囲18が加えられた；他の請求の範囲は変更無し。（1頁）〕

ターに比して好中球エラスターゼに対する阻害活性が増強された請求の範囲6～10のいずれかに記載の新規ポリペプチド。

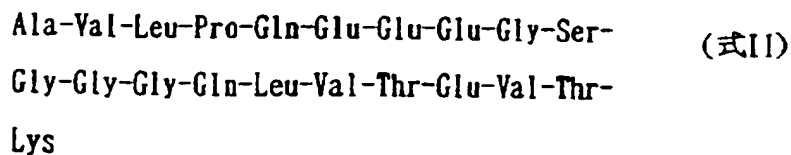
13. 請求の範囲6～12のいずれかに記載の新規ポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とするDNA。

14. 請求の範囲13記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。

15. 請求の範囲14記載のベクターで形質転換された形質転換体。

16. 請求の範囲15記載の形質転換体を培養して、請求の範囲6～12のいずれかに記載の新規ポリペプチドを産生させ、得られる培養物から当該新規ポリペプチドを採取することを特徴とする請求の範囲6～12のいずれかに記載の新規ポリペプチドの製造方法。

17. （補正後）プロテアーゼインヒビターの活性部位を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'末端側に、下記式（II）のアミノ酸配列をコードする塩基配列が結合された酵母用発現ベクターにて形質転換された酵母を培養することを特徴とするプロテアーゼインヒビターの発現増強方法。



18. （追加）酵母用発現ベクターがピキア属酵母用発現ベクター、および酵母がピキア属酵母である請求の範囲17記載のプロテアーゼインヒビターの発現増強方法。

図 1

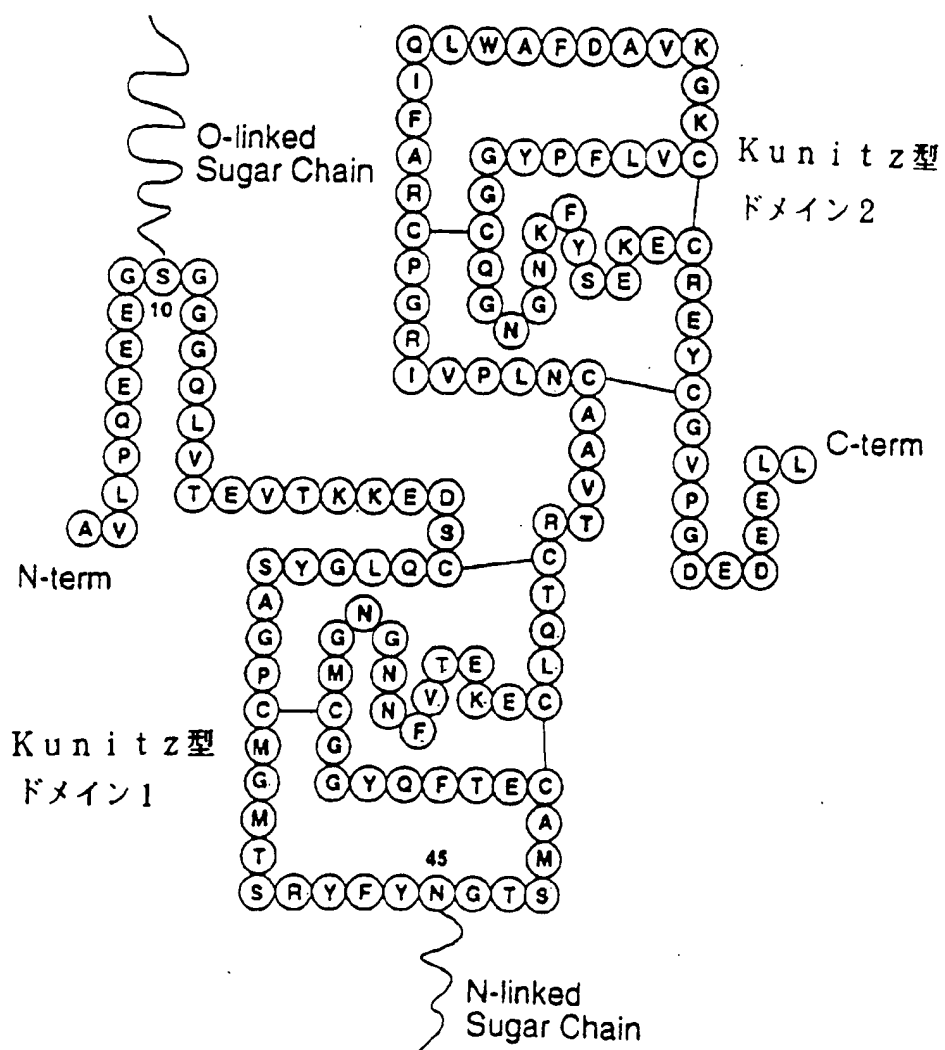
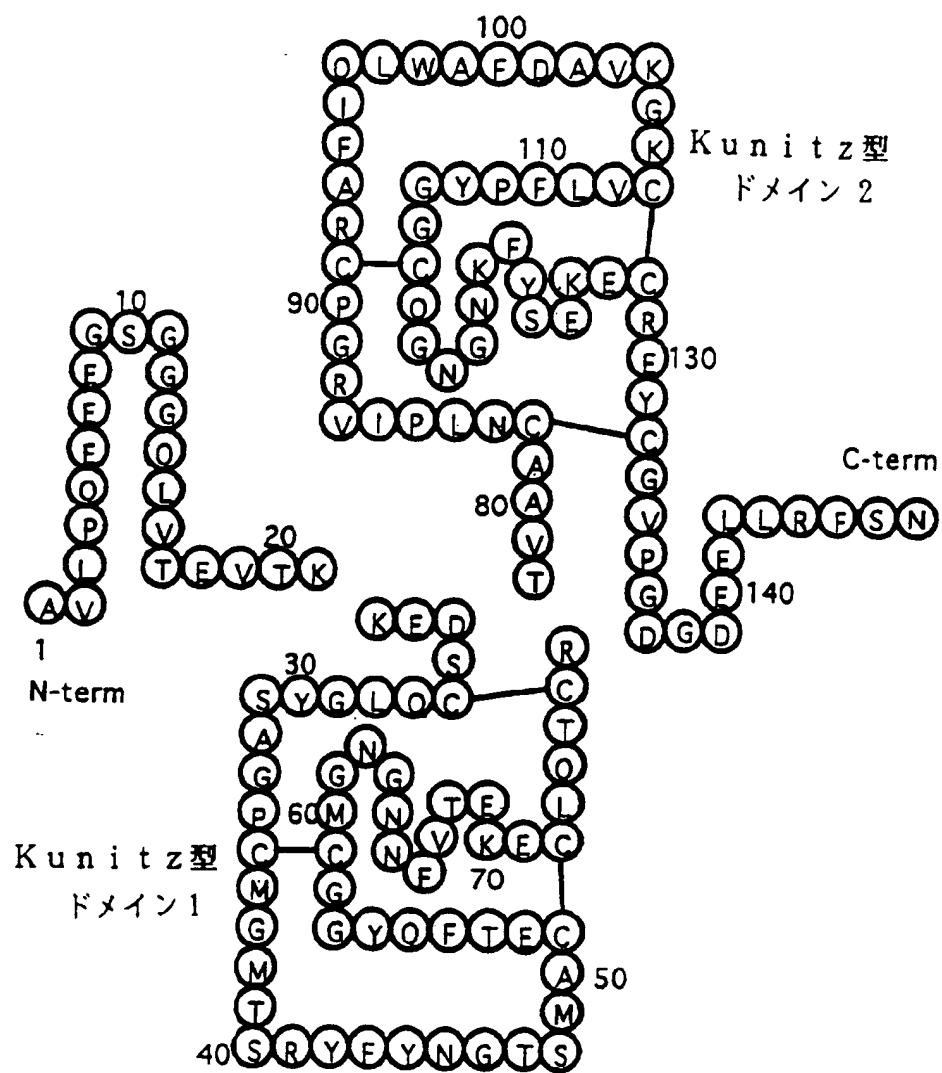


図 2



3

-1

-20

CGCGGTGGCCCTTCTGTTC

1

60

TAGACCGAGCCTGTGGATATACCAAGGCAGAGGCCCATAGCCATGAGGAGCCTCGGG

61

120

GCCCTGCTCTGCTGCTGAGCGCCTGCCCTGGCGGTGAGCGCTGGCCCTGTGCCAACGCCG

3 / 28

121

180

CCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGTAC

181

240

AACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTG

☒ 4

241	300
AGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCACTCGT	
301	360
TGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAACAGATACTGATGGG	
361	420
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCCTATGTGTCCACACC	
421	480
AACTATGATGAGTATGCCATTTTCCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCCATCATGGACCCACC	
481	540
ATTACTGCCAAGCTCTACGGGGCGGGCGCCGAGCTGAGGGAACCTCTCCTGCAGGACTTC	

BbeI

5

541

AGAGTGGTTGCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGA 600

601

GGTGAATGTGTCCCTGGGAGCAGGAACAGAGCCCATCTTAATCCCGAGAGTCCGGAGG 660

AvaI

661

Sau3AI

720

GCTGTGCTACCCCAAGAAGAGGAGGATCAGGGGTGGGCAACTGGTAACTGAAGTCACC 720

AlaValLeuProGlnGluGluGlySerGlyGlyGlnLeuValThrGluValThr 20

5 / 28

721

780

AAGAAAGAAGATTCTGCCAGCTGGGCTACTCGGCCGGTCCCTGCATGGGAATGACCAGC 780

LysLysGluAspSerCysGlnLeuGlyTyrSerAlaGlyProCysMetGlyMetThrSer 40

☒ 6

781  
840  
AGGTATTCTATAATGGTACATCCATGGCCTGTGAGACTTTCAGTACGGCGGCTGCATG  
ArgTyrPheTyrAsnGlyThrSerMetAlaCysGluThrPheGlnTyrGlyGlyCysMet 60

841  
900  
Pst I  
GGCAACGGTAACAACTTCGTACAGAAAAGGAGTGTCTGCAGACCTGCCGAACGTGGCG  
GlyAsnGlyAsnAsnPheValThrGluLysGluCysLeuGlnThrCysArgThrValAla 80

901  
960  
Apa I  
GCCTGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCCCTGCCGAGCCTTCATCCAGCTCTGGGCATTT  
AlaCysAsnLeuProIleValArgGlyProCysArgAlaPheIleGlnLeuTrpAlaPhe 100

961  
1020  
GATGCTGTCAAGGGGAAGTGCCTCTCTTCCCCCTACGGGGGCTGCCAGGCAACGGGAAC  
AspAlaValLysGlyLysCysValLeuPheProTyrGlyGlyCysGlnGlyAsnGlyAsn 120



7

1021 1080  
AAGTTCTACTCAGAGAAGGAGTGCAGAGAGTACTGCCGGTGTCCCTGGTGATGGTGATGAG  
LysPheTyrSerGluLysGluCysArgGluTyrCysGlyValProGlyAspGlyAspGlu 140

1081 HhaI 1140  
GAGCTGCTGCGCTTCTCCAACTGACAACTGGCCGGTCTGCAAGTCAGAGGATGGCCAGTG  
GluLeuLeuArgPheSerAsn\*\*\*

1141 SmaI HhaI 1200  
TCTGTCCCGGGTCTGTGGCAGGCAGCGCCCAAGCAACCTGGGTCCAAATAAAAACTAAA

1201  
TTGTAAACTCCTGAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

• N末端

#646

!->HI-30

#689

CCGAGAGTCCGGAGGGCTGTGCTACCCCAAGAAGAGGAAGGATC

↓

CCGAGAGTCCGGAGCGCTGTGCTACCCCAAGAAGAGGAAG

CTCAGGCCCTCGCGACACGATGGGGTTCTTCTCCTTCCCTAG

Aval

Aor51HI

Sau3AI

• C末端

#1086

#1151

GCGCTTCTCCAACTGACAACTGGCCGGTCTGCAAGTCAGAGGATGGCCAGTGCTGTGTCCCGGG

↓ 6, 21塩基欠失

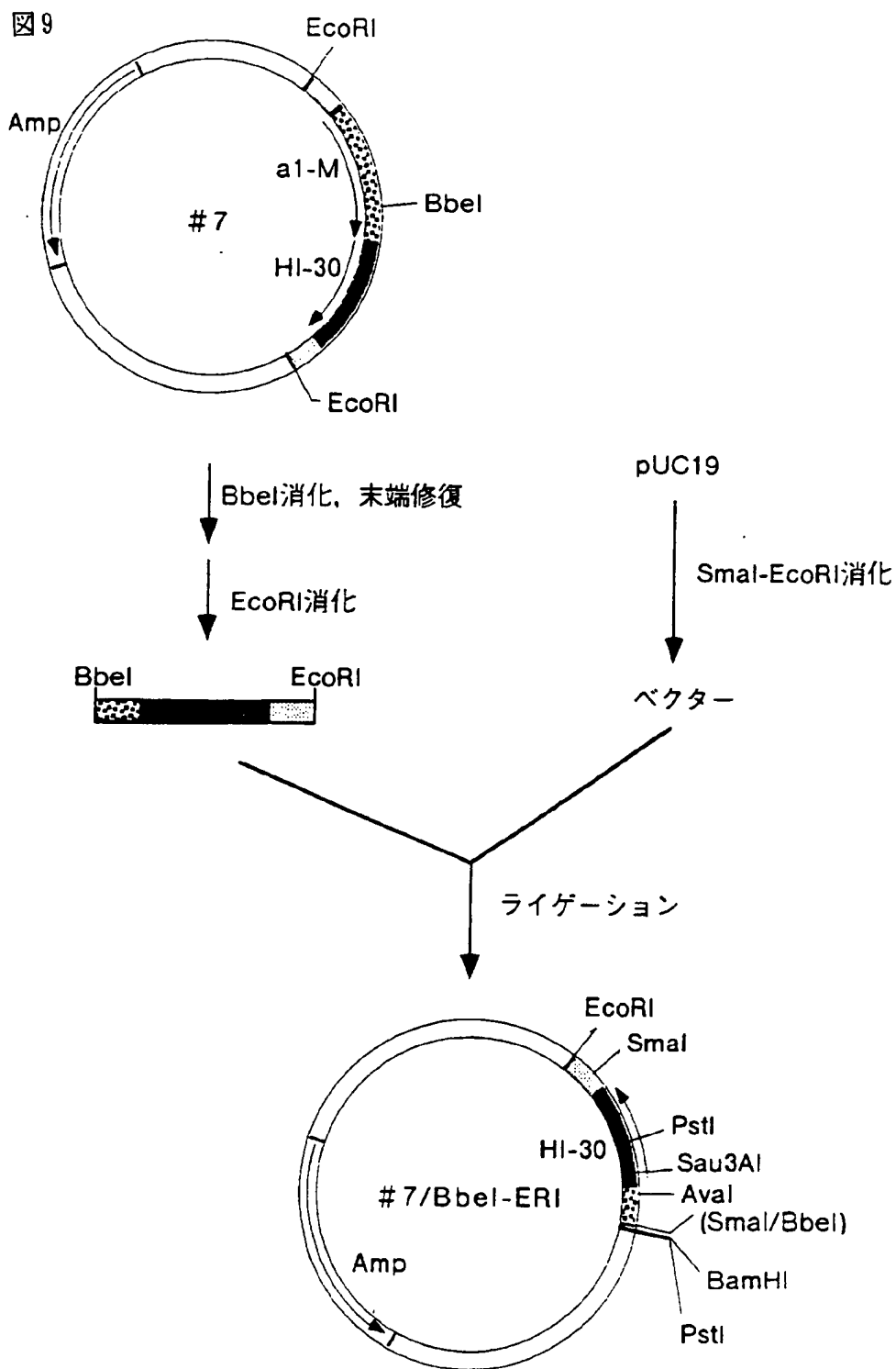
CTTCTGACAACTGGCCGGAGTGCTGTGTCCC

GCGAAGACTGTTGACCCGGCCTCACAGACAGGG

HhaI

SmaI

8



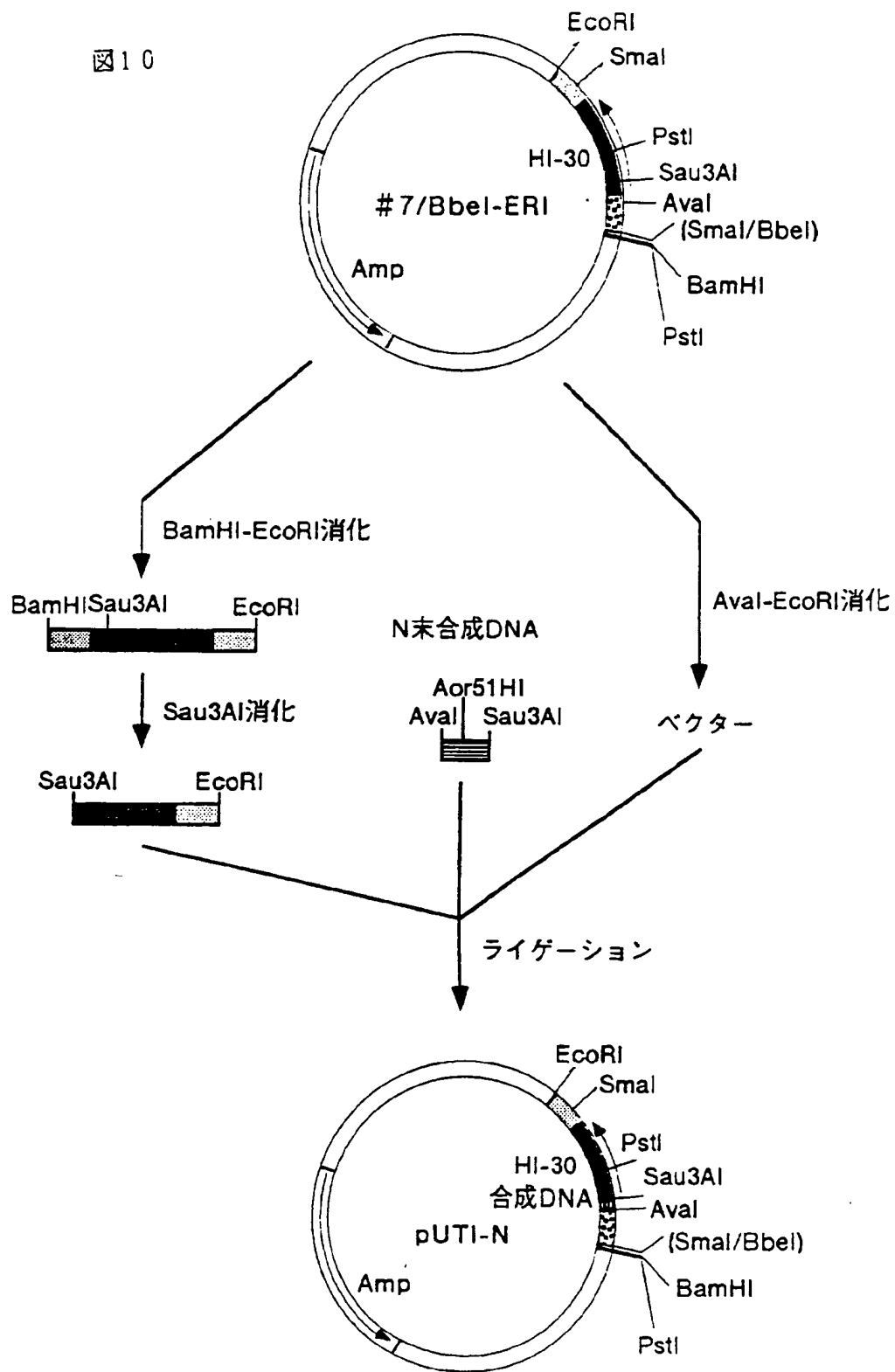


図 11

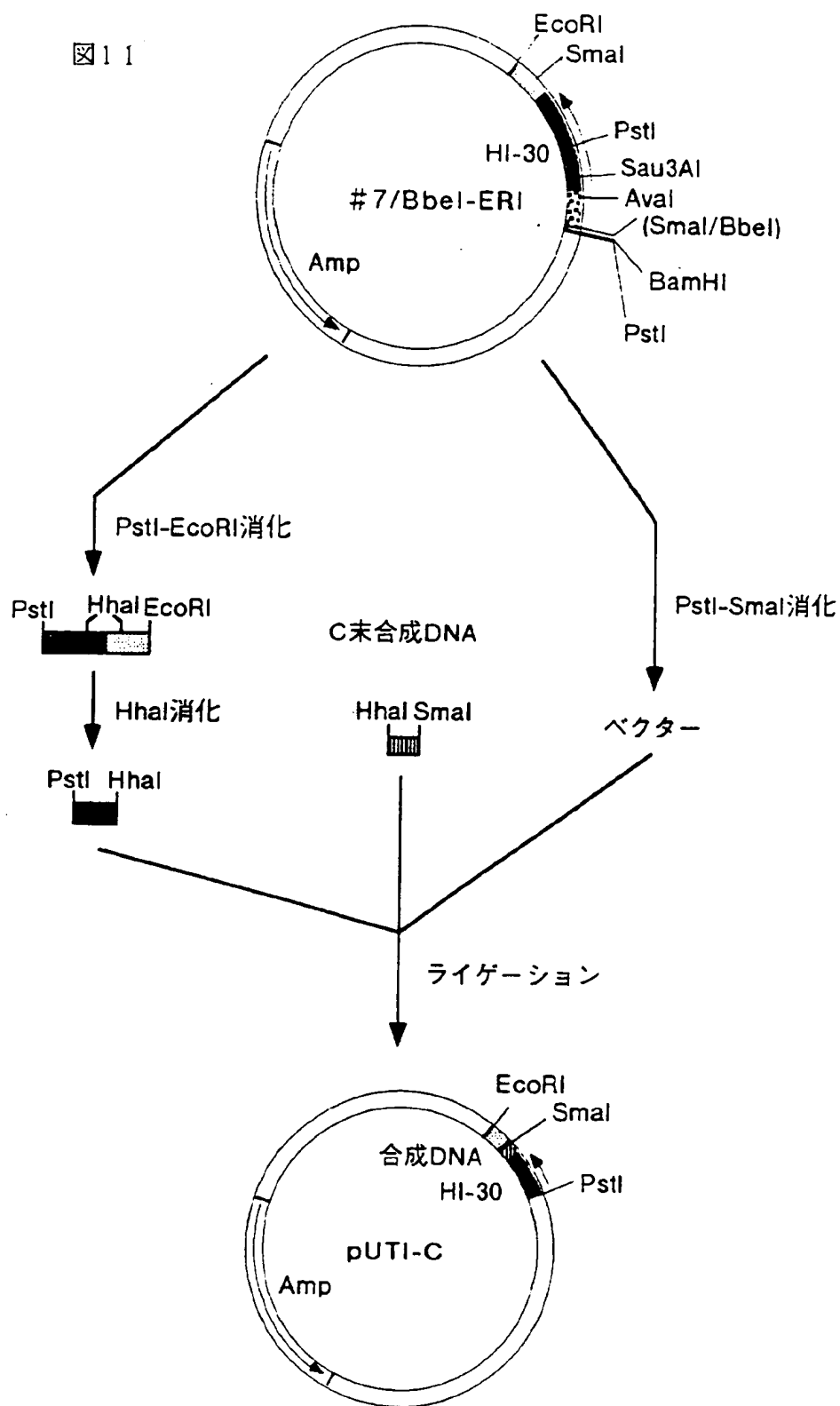


図 12

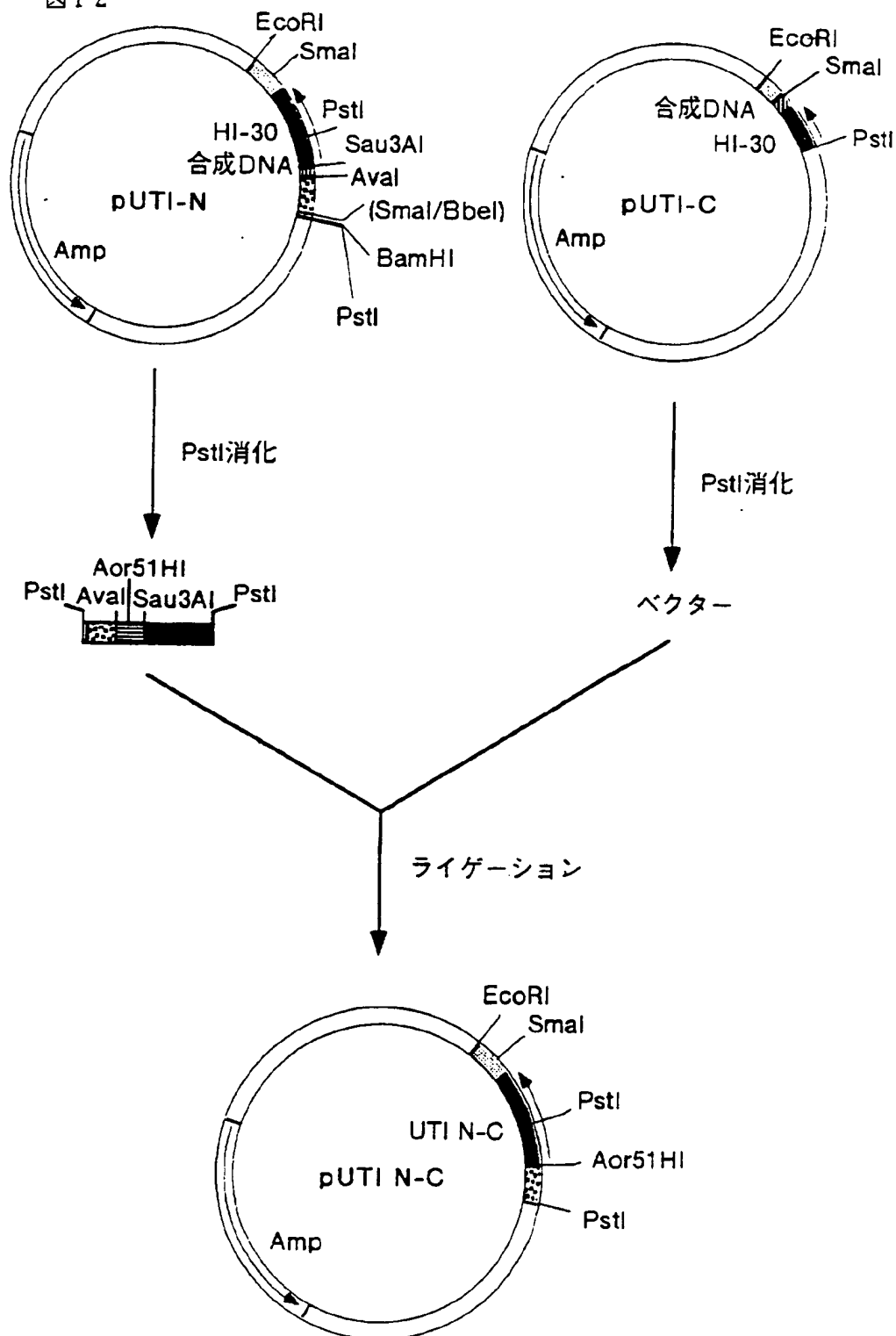


図 13

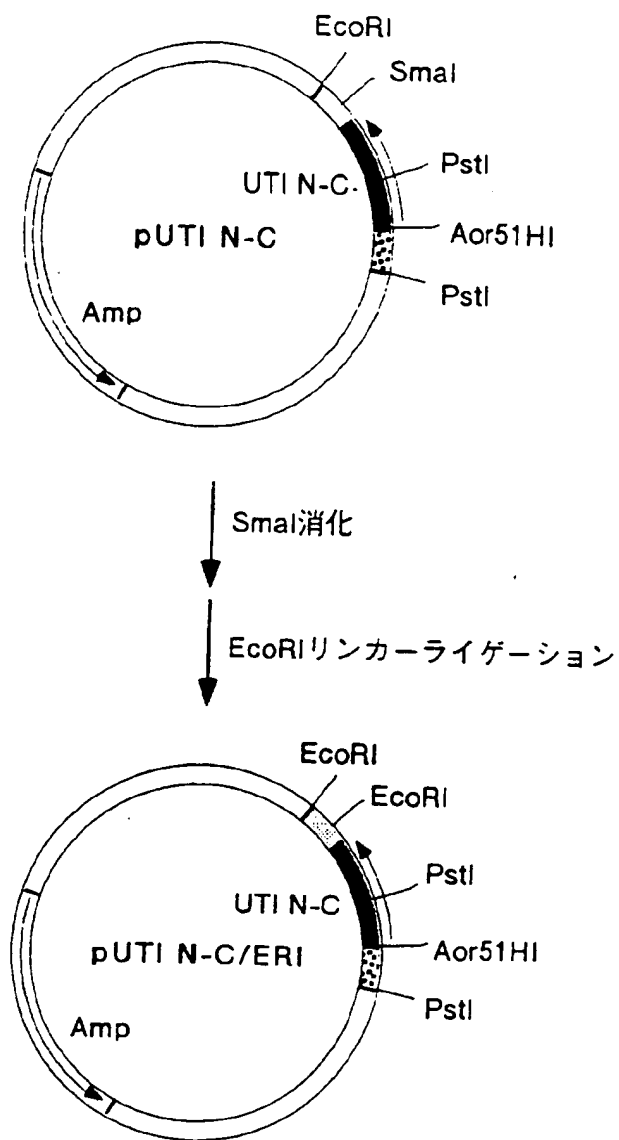


図 14

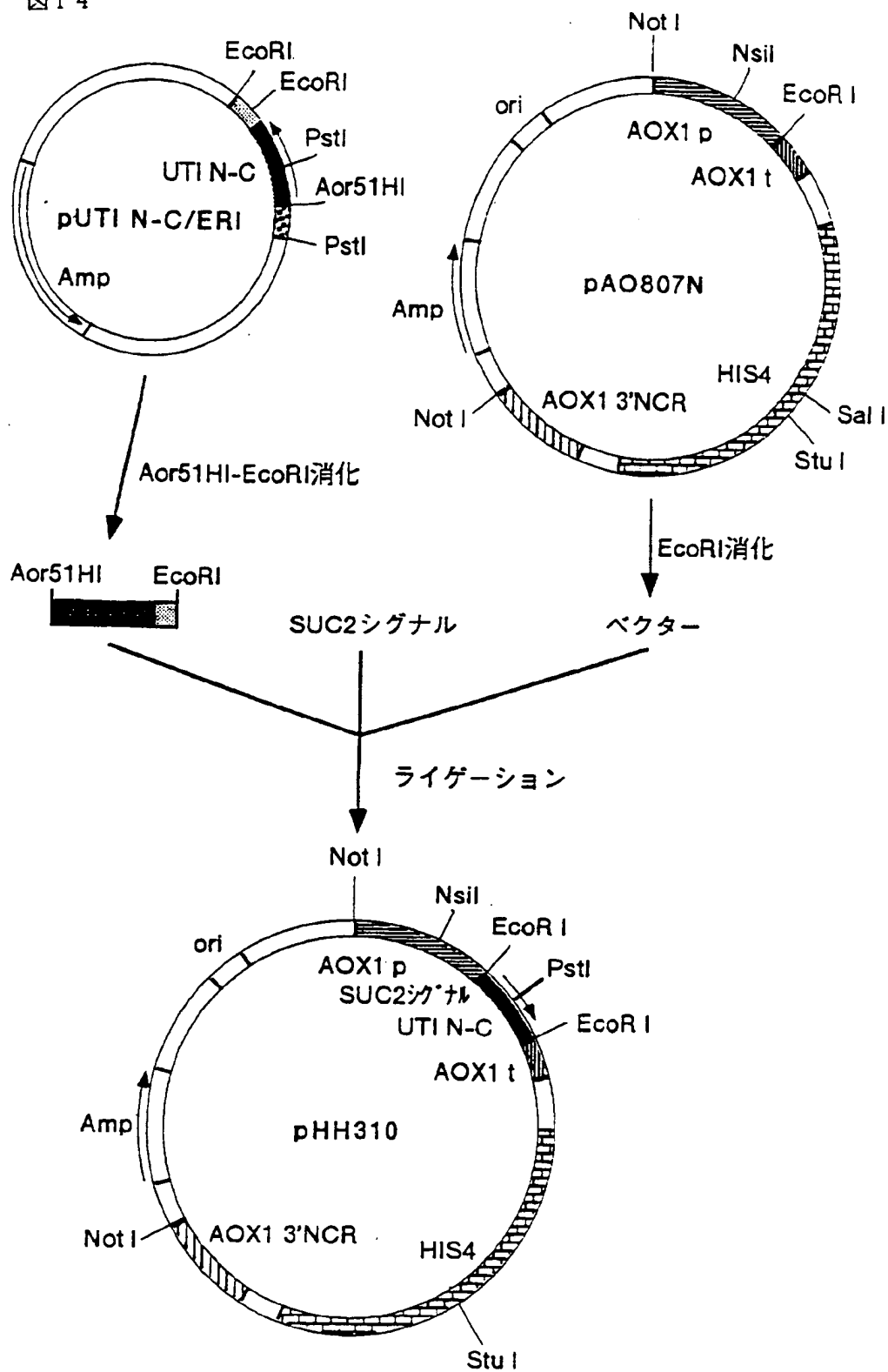




図 15

SUC2: 5' AATTCATGATGCTTTTGCAAGCTTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTCGCTGCCAAGATTTCTGCT  
 3' GTACTACGAAACGTTCCGAAAGGAAAGGAAACCGACCAAGCGACGGTTCTTAAAGACGA  
 EcoRI HindIII

~~~~~: 最適化のため変更した塩基  
 \_\_\_\_\_: 制限酵素認識部位

図16

LeuGlnThrCysArg\*\*\*  
                   GACCTGCCGATG                  12mer (D1-1)  
          ACGTCTGGACGGCTACTTAA                    20mer (D1-2)  
           PstI                                  EcoRI

下線：制限酵素認識部位  
 二重下線：停止コドン

図17

ThrValAlaAlaCysAsnLeuProIleValArgGly  
 ACTGTGGCGGCCTGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCC  
                   ↓  
 5' ACTGTGGCGGCATGCAATCTCCCCATAGTCCGGGGCC 37mer (D2-1)  
 3' TGACACCGCCCGTACGTTAGAGGGGTATCAGGCC 33mer (D2-2)  
                   SphI                                  ApaI

下線：制限酵素認識部位  
 ■：置換する塩基

図 18

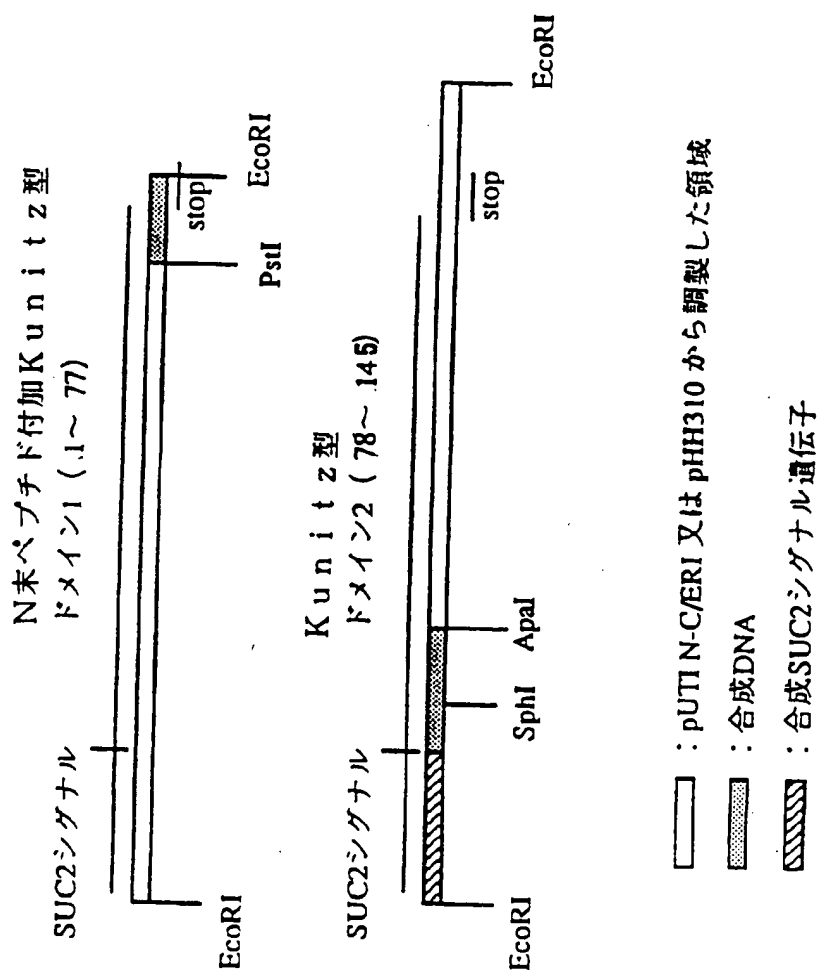


図 19

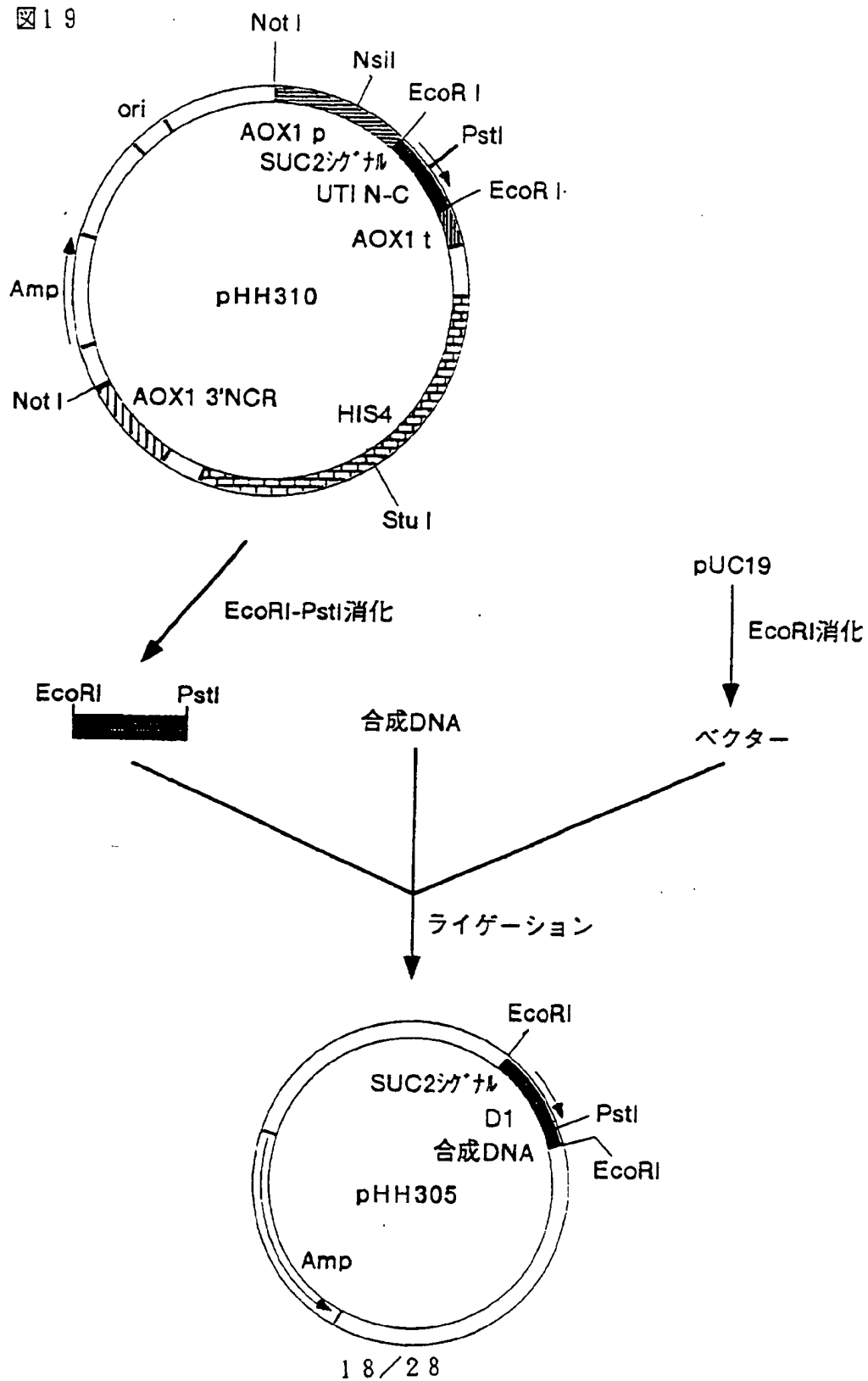


図 20

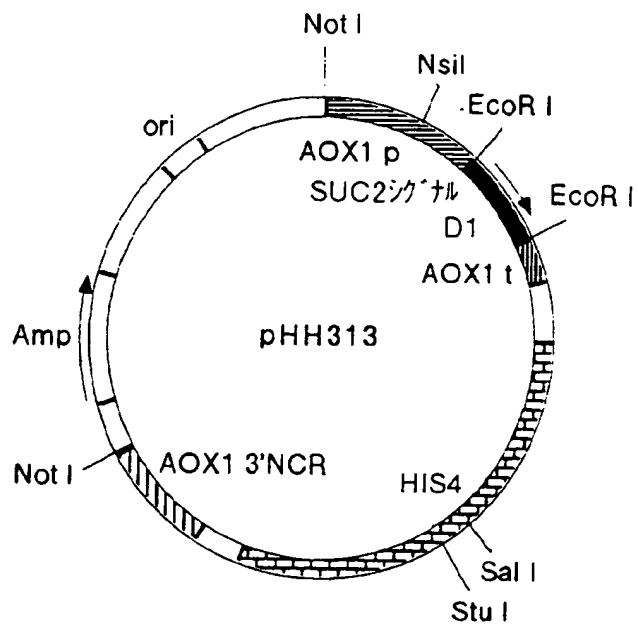
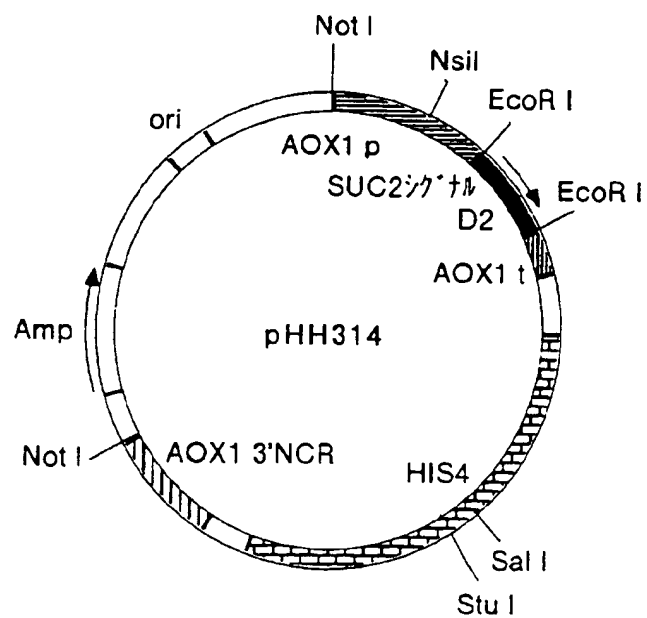


図 22



21

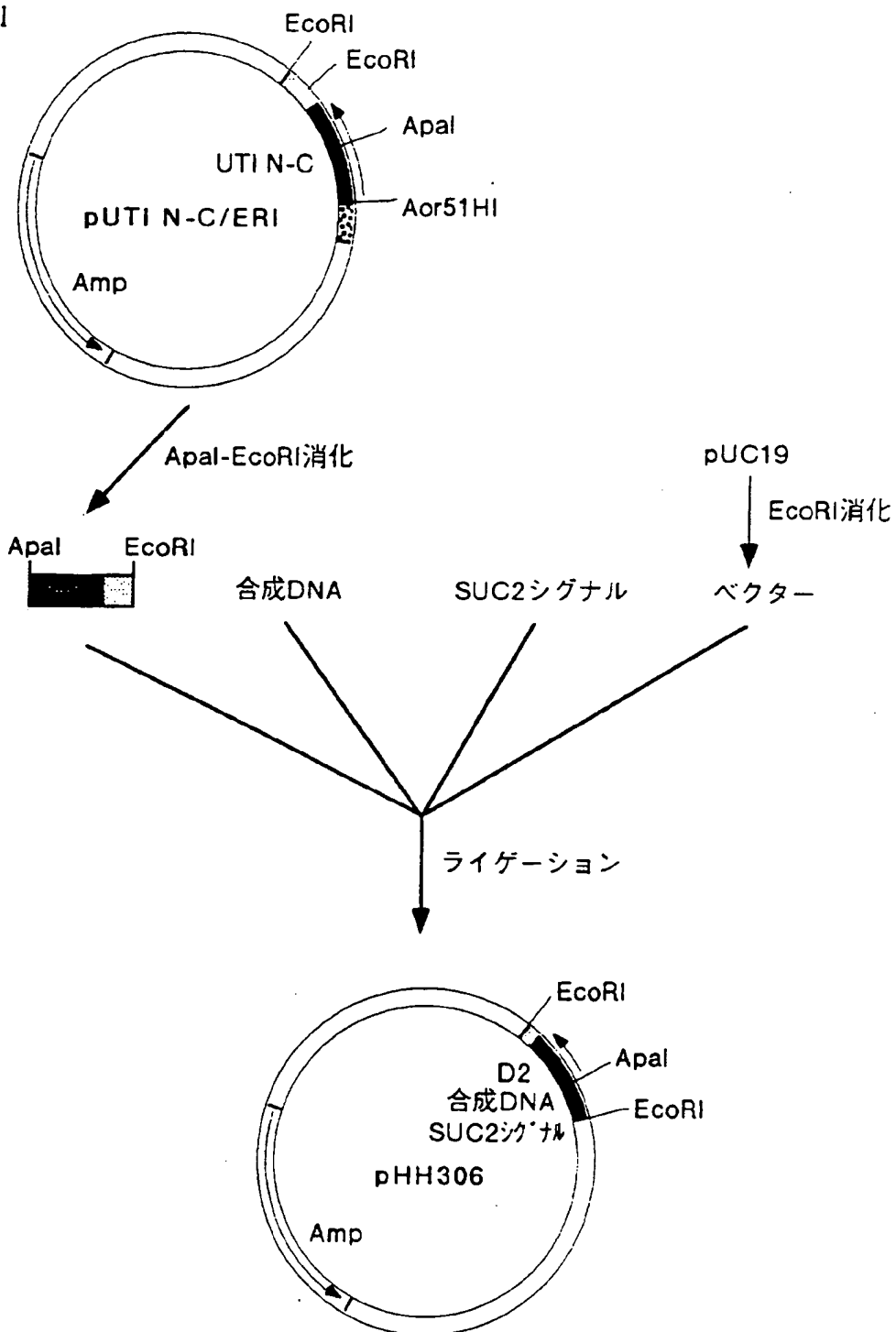


図 23

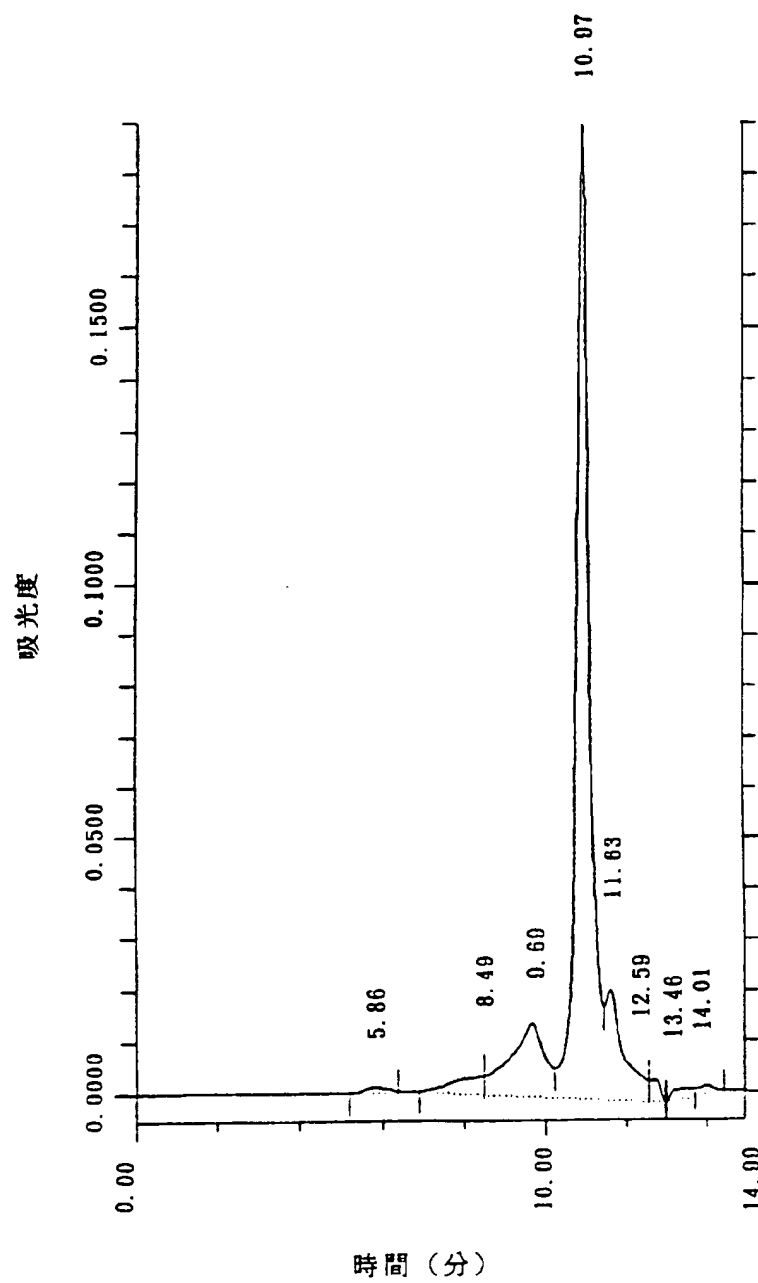
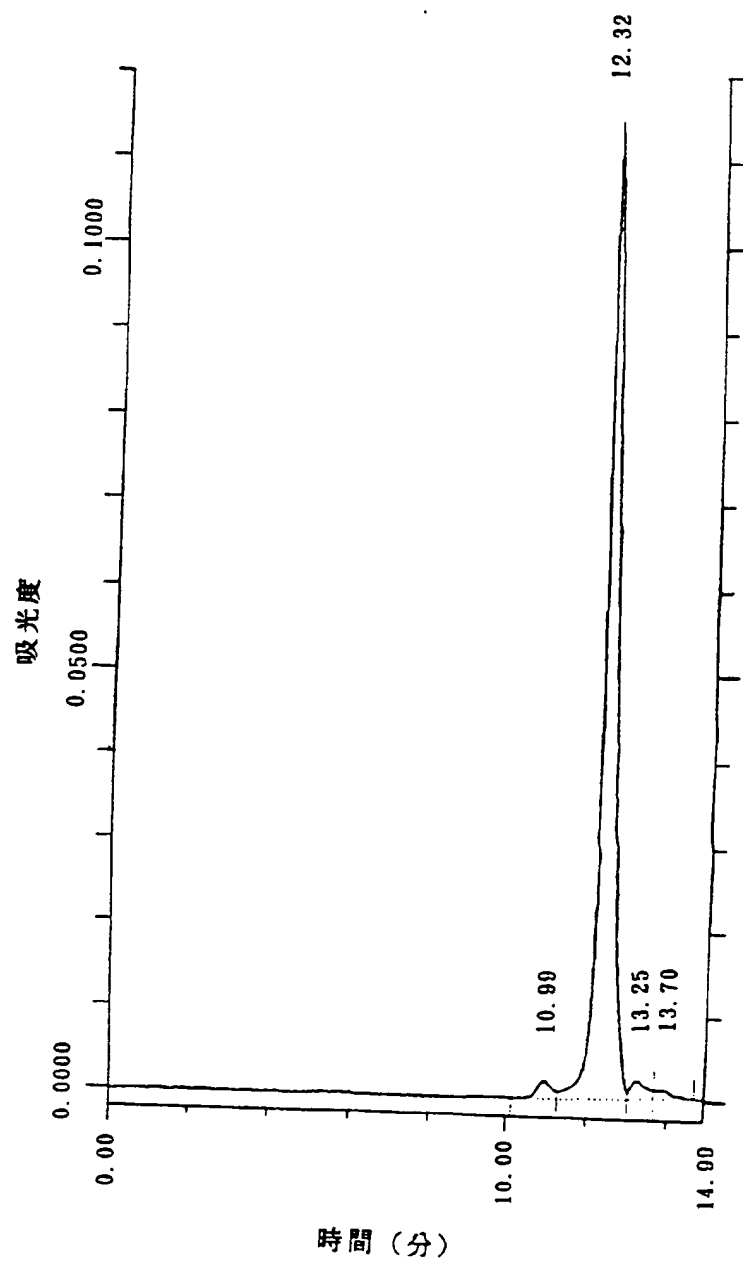


図 24





25

NotI  
 GCG GCC GCC AAA GAA GAT TCC TGC CAG CTG GGC TAC TCG GCC GGT CCC TGC ATC  
 A A A K E D S C Q L G Y S A G P C I  
  
BlnI  
 GCT TTC TTT CCT AGG TAT TTC TAT AAT GGT ACA TCC ATG GCC TGT GAG ACT TTC  
 A F F P R Y F Y N G T S M A C E T F  
  
 CAG TAC GGC GGC TGC ATG GGC AAC GGT AAC AAC TTC GTC ACA GAA AAG GAG TGT  
 Q Y G G C M G N G N N F V T E K E C  
  
 CTG CAG ACC TGC GGT GTC CCT GGT GAT GGT GAT GAG GAG CTC CTG CGC TTC GCG  
 L Q T C G V P G D G D E E L L R F A  
  
NotI  
 GCC GCT  
 A A

..... : mutagenic primerに用いた領域 (EpiI プライマー領域)

==== : P1 ~ P4'

図 26

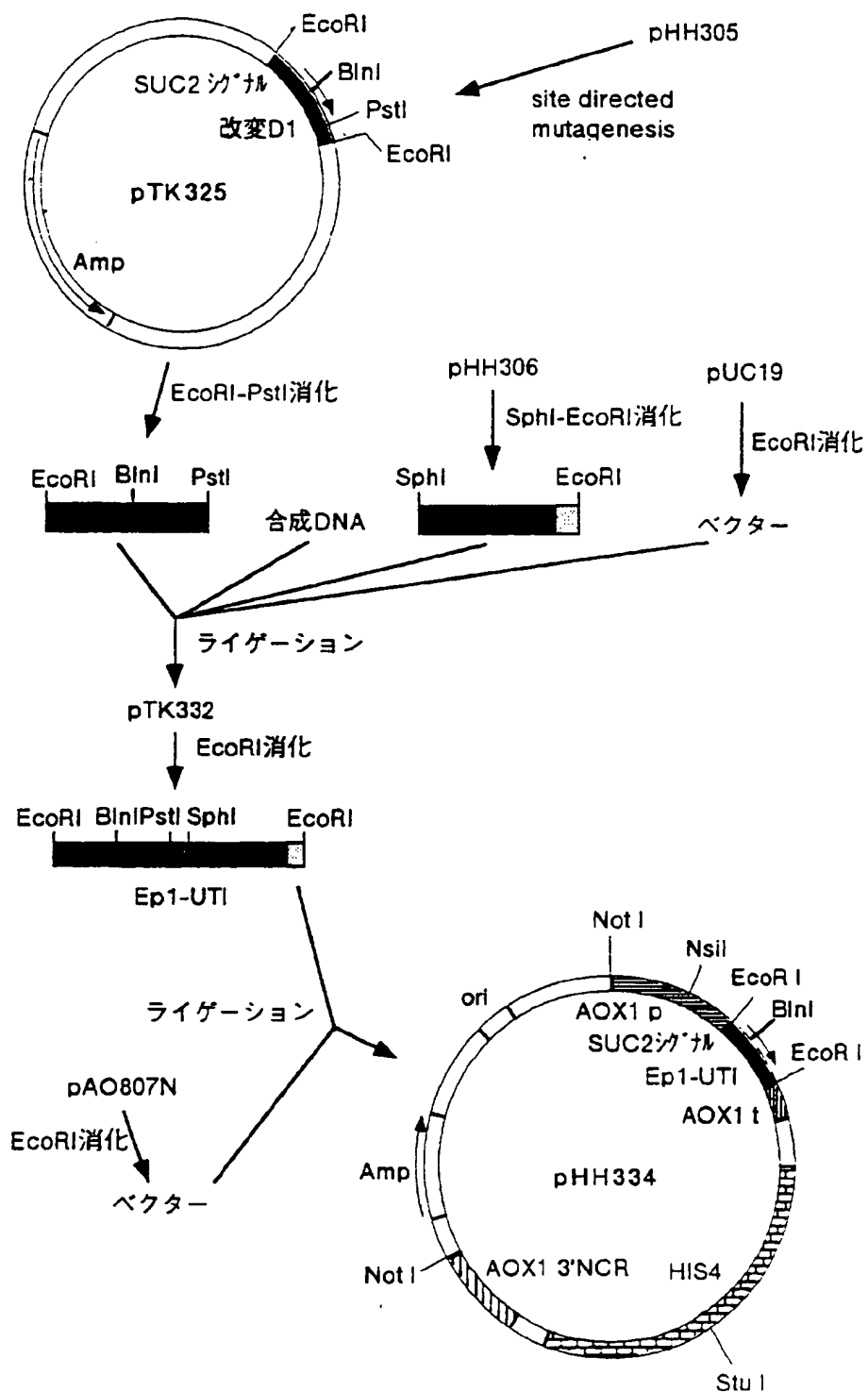


図27

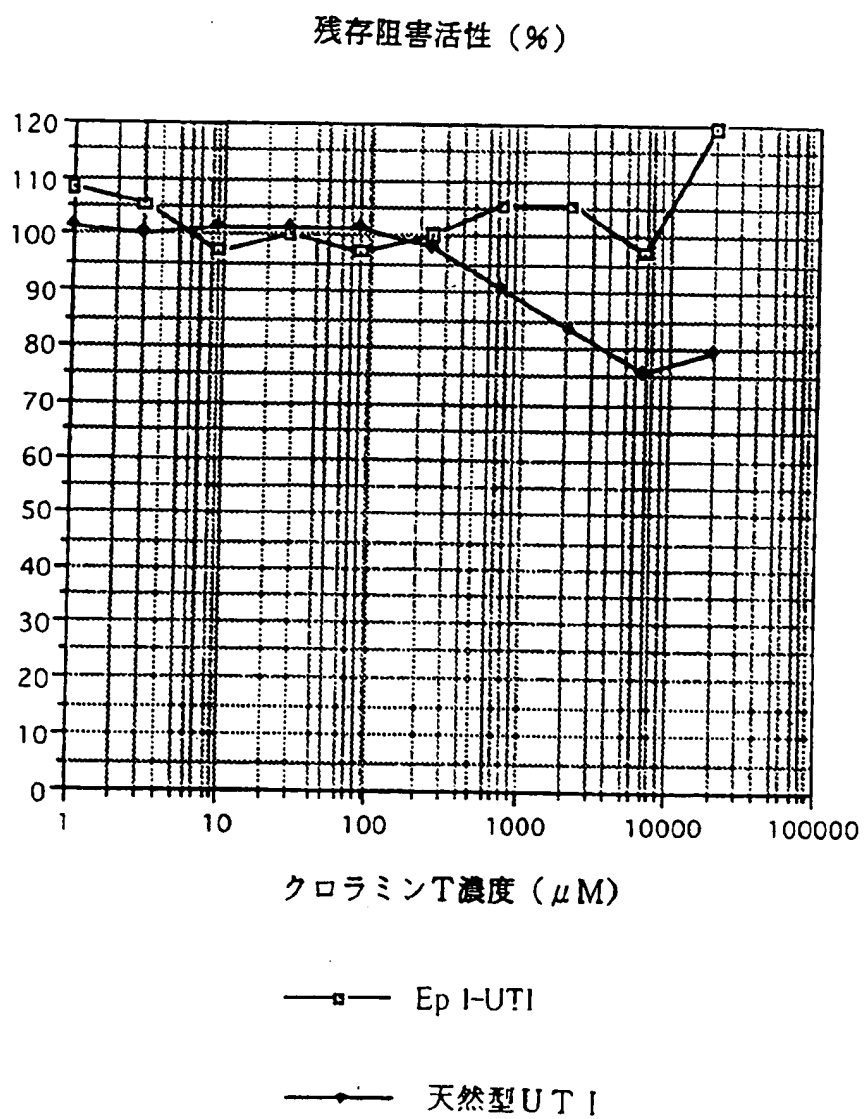


図 28

(PvuII)                      Eco52I

5' AAAGAAGATTCCTGCCA ACTGGGCTA<sup>c</sup>TC

TTTCTTCTAAGGACGGTTGACCCGATGAGCCGG 5'

図 Ep1-d21 N末合成DNA

A: PvuIIサイト消失のために置換した塩基

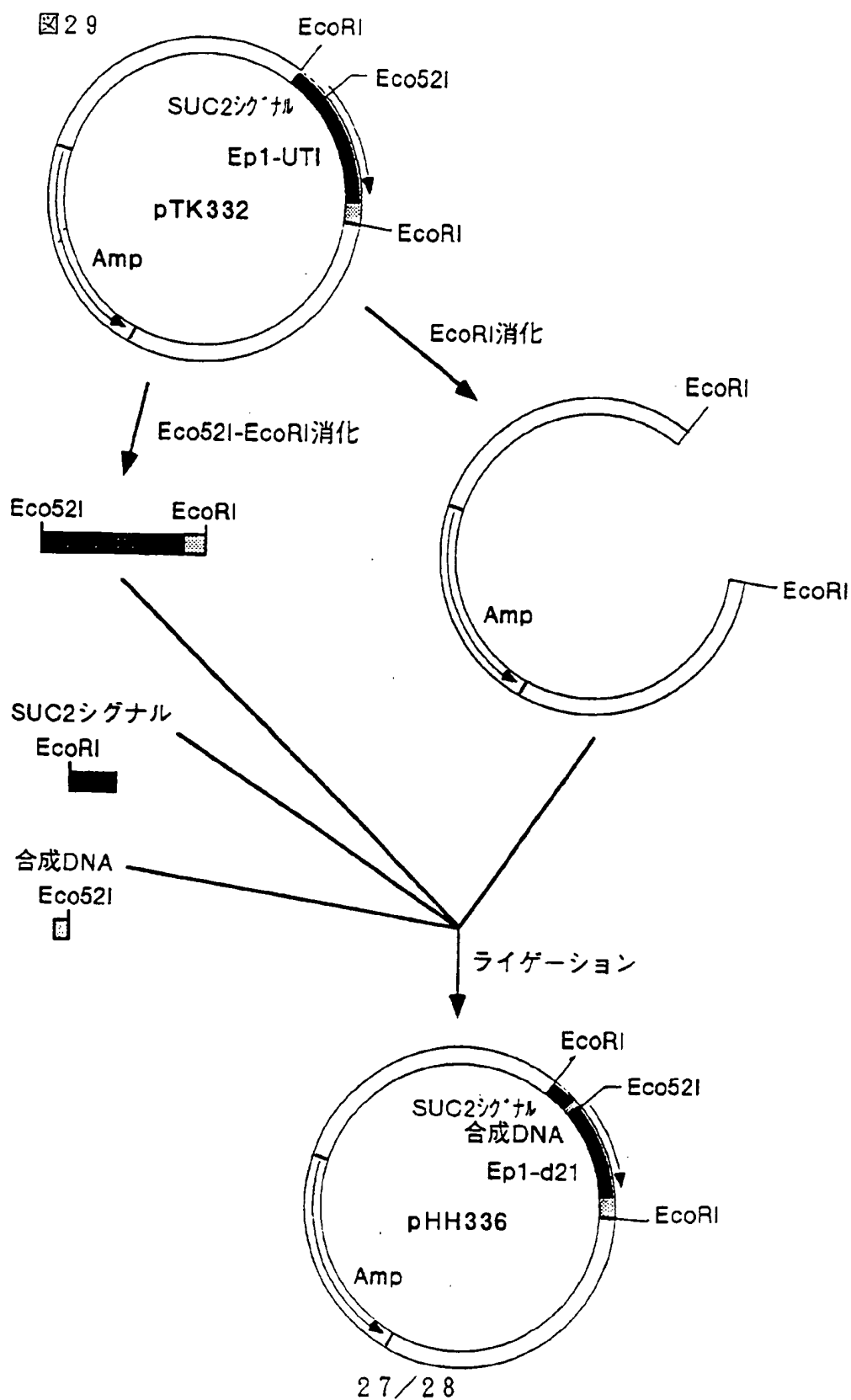
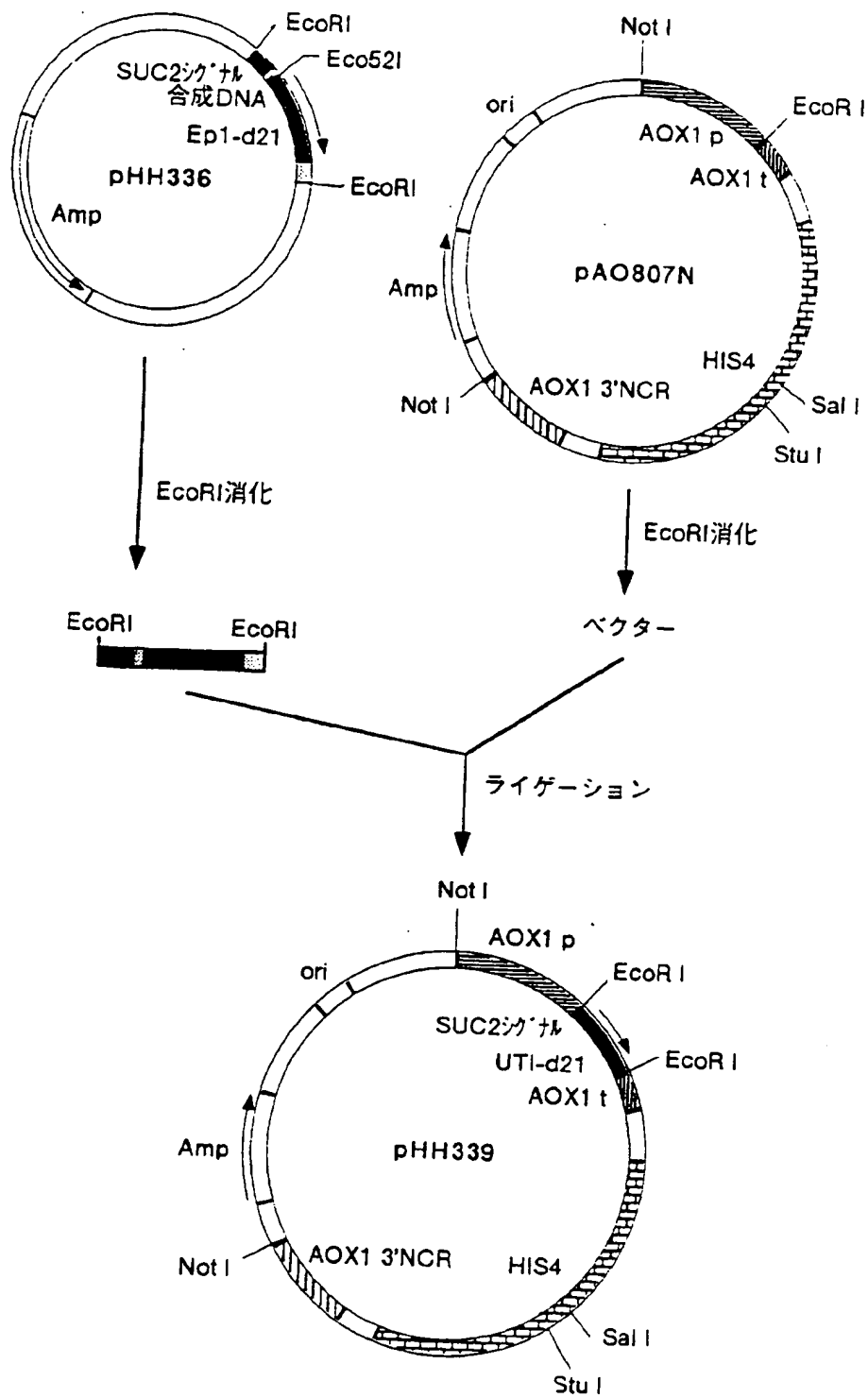


図 30



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01449

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/81, C12N1/19, C12P21/02, C07K14/47, C07K14/81, C12N9/99

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C12N15/81, C12N1/19, C12P21/02, C07K14/47, C07K14/81, C12N9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                            | Relevant to claim No.      |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| $\frac{X}{Y}$<br>A | KAUMEYER, J. F. "The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor also encodes $\alpha$ -1-microglobulin (protein HC)"<br>Nucleic Acids Research, 1986, Vol. 14, No. 20, pages 7839-7850 | $\frac{17}{1-5}$<br>6 - 16 |
| Y                  | JP, 5-84083, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.),<br>April 6, 1993 (06. 04. 93)<br>& EP, 486001, A1 & CA, 2055425, A<br>& AU, 641568, B & US, 5409895, A                                                                                     | 2, 4, 5                    |
| Y                  | JP, 63-44899, A (Phillips Petroleum Co.),<br>February 25, 1988 (25. 02. 88)<br>& EP, 256421, A1 & AU, 8774747, A<br>& NO, 8703325, A & DK, 8704178, A                                                                                         | 1 - 5                      |
| P, X               | JP, 6-315386, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.),<br>November 15, 1994 (15. 11. 94)                                                                                                                                                         | 17                         |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
November 2, 1995 (02. 11. 95)Date of mailing of the international search report  
November 21, 1995 (21. 11. 95)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01449

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|           | & EP, 624644, A1 & AU, 9461814, A<br>& CA, 2122556, A                              |                       |



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/12, C12N15/81, C12N1/19,  
C12P21/02, C07K14/47, C07K14/81,  
C12N9/99

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N15/12, C12N15/81, C12N1/19,  
C12P21/02, C07K14/47, C07K14/81,  
C12N9/99

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー*           | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                             | 関連する<br>請求の範囲の番号                |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <u>X</u><br><u>Y</u><br>A | KAUMEYER, J. F. "The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor also encodes $\alpha$ -1-microglobulin (protein HC)"<br>Nucleic Acids Research, 1986, Vol. 14, No. 20, pages 7839-7850 | <u>17</u><br><u>1-5</u><br>6-16 |
| Y                         | JP, 5-84083, A (持田製薬株式会社),<br>6. 4月, 1993 (06. 04. 93)<br>& EP, 486001, A1&CA, 2055425, A                                                                                                                                                     | 2, 4, 5                         |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 11. 95

国際調査報告の発送日

21.11.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号120

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 B 9 2 8 2

電話番号 03-3581-1101 内線

3449

C (続き). 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                            | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Y               | &AU, 641568, B&US, 5409895, A<br><br>JP, 63-44899, A (フィリップス・ペトロリウム・カンパニー),<br>25. 2月. 1988 (25. 02. 88)<br>&EP, 256421, A1&AU, 8774747, A<br>&NO, 8703325, A&DK, 8704178, A | 1-5              |
| P, X            | JP, 6-315386, A (持田製薬株式会社),<br>15. 11月. 1994 (15. 11. 94)<br>&EP, 624644, A1&AU, 9461814, A<br>&CA, 2122556, A                                                               | 17               |